

Elaine Raniero Fernandes

**O processo inflamatório, a resposta imune “in situ”
e a morte neuronal em sistema nervoso central de
pacientes com raiva transmitida por morcegos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof^a.Dr^a.Maria Irma Seixas Duarte

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Elaine Raniero

O processo inflamatório, a resposta imune “in situ” e a morte neuronal em sistema nervoso central de pacientes com raiva transmitida por morcegos / Elaine Raniero Fernandes. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Maria Irma Seixas Duarte.

Descritores: 1.Raiva 2.Sistema nervoso central 3.Inflamação 4.Imunoistoquímica
5.Quirópteros

USP/FM/SBD-142/09

Aos pacientes que faleceram em decorrência da infecção rábica

Aos meus queridos pais Ailor Fernandes e Rosely Raniero Fernandes

Ao meu esposo Ronaldo Rago Campos

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Maria Irma Seixas Duarte, pela orientação, pela oportunidade de crescimento e por me ensinar que concluir uma tese é a capacidade de vencer frustrações.

Ao Prof^o. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, chefe do Laboratório de Protozoologia do IMT, exemplo de pesquisador e ao qual agradeço imensamente pelo apoio e por estar sempre presente em todas as fases desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Penteado Lancellotti, professora titular da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, por ter me apresentado ao universo maravilhoso do cérebro, através de cortes e lâminas histológicas, fazendo com que eu me tornasse uma "neurointeressada".

Ao Prof^o. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto, coordenador do curso de pós-graduação em Patologia da FMUSP, pela oportunidade e à Liduvina da Silva Neta de Barros, secretária da pós-graduação em Patologia da FMUSP, pela paciência e pelo apoio durante a execução dessa tese.

Ao Prof^o. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma, docente da Universidade Federal do Pará, o qual nos cedeu toda a casuística para realização desse trabalho e que sempre contribuiu com sugestões.

Ao Dr. João Pinheiro, do Hospital Universitário João de Barros Barreto – PA, aos médicos do hospital e aos pesquisadores do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, por terem trabalhado nos casos de raiva e os cedido para esse trabalho.

Ao Prof^o. Dr. Pedro Vasconcellos, pesquisador do Instituto Evandro Chagas, por me fornecer o anticorpo anti-raiva utilizado nas reações imuno-histoquímicas dessa tese.

Ao Prof^o. Dr. Carlos Augusto G. Pasqualucci, chefe do Serviço de Verificação de Óbito da Capital (SVOC), por ter autorizado a obtenção de cérebros normais para realização do grupo controle desse trabalho, ao Sr. Nilton, funcionário do SVOC e aos demais técnicos de necropsia, pelas várias visitas ao SVOC, sempre me informando sobre os possíveis casos-controle.

À Dr^a Lea Grinberg, pesquisadora do Laboratório de Envelhecimento Cerebral da FMUSP, e às biomédicas Edilaine Tampellini e Kátia Oliveira pela ajuda nos cortes de cérebros normais utilizados como grupo controle desse trabalho.

Aos residentes da Patologia da FMUSP e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo que sempre se mostraram solícitos em me fornecerem casos de cérebro normais.

Às funcionárias e amigas do Laboratório de Histopatologia da FMUSP: Cássia, Celina, Ericléia, Paulinha, Keila, Keli, Marina, Rose, Weluma, que muito contribuíram realizando o processamento histológico das lâminas utilizadas nesse trabalho.

Ao Dr. Marcelo Yoshito Wada, pesquisador do Ministério da Saúde, pela ajuda no fornecimento de dados epidemiológicos da raiva em nosso país.

Ao Prof^o. Dr. Chin Jia Lin, docente da Faculdade de Medicina da USP e chefe do Laboratório de Patologia Molecular, pela colaboração na extração de RNA em material parafinado para realização da RT-PCR e pelas sugestões.

Ao Instituto Pasteur de São Paulo, em especial a Dr^a Neide Takaoka, Dr^a Ivanete Kotait e Dr^a Maria Luiza Carrieri, por me receberem de braços abertos na instituição, disponibilizando toda a ajuda necessária para o desenvolvimento da RT-PCR e para o meu aprimoramento sobre o vírus da raiva.

À Dr^a. Juliana Galera Castilho, pesquisadora do Instituto Pasteur de São Paulo, pela paciência pelas inúmeras tentativas para padronização da RT-PCR em material parafinado, pela correção da metodologia específica da técnica, mas, sobretudo pela amizade.

Aos amigos Samira Achkar, Graciane Caporale, Ekaterina Ono, Pedro Carrieli Jr. do Instituto Pasteur de São Paulo, que sempre se mostraram dispostos a me auxiliar no que fosse necessário para realização desse trabalho.

A Roselaine P. A. Cardoso, funcionária do Laboratório de Protozoologia do IMT, pela essencial ajuda na execução do Western-Blot para garantir a especificidade do nosso anticorpo anti-raiva e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia do IMT, que sempre torceram por esse trabalho, em especial ao Dr. Andrés J. Galisteo Jr. e Dr^a Luciana R.M.J. Ekman que contribuíram para a realização do Western-blot.

Ao Prof^o. Dr. Jorge Simão Casseb e Prof. Dr. Gil Benard, pesquisadores da Faculdade de Medicina da USP, pelas sugestões no meu exame de qualificação.

Ao Prof^o. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, chefe do Departamento de Patologia da FMUSP e ao Prof^o. Dr. Marcelo Nascimento Burattini, professor associado do Departamento de Patologia da FMUSP, por terem me proporcionado à oportunidade de participar da XIX International Conference on Rabies in the Americas (RITA) – Atlanta - USA, no ano de 2008, na qual pude apresentar parte desse trabalho e aprimorar meus conhecimentos em relação à infecção rábica.

Aos amigos do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da FMUSP: à Dr^a. Carla Pagliari, por me ensinar tudo que eu sei sobre imuno-histoquímica; à Cleusa Takakura, por sua pronta disponibilidade; à Luciane Kanashiro, por estar sempre disposta a ajudar no que fosse preciso; à Mônica Kauffman, pela orientação na parte prática de Biologia Molecular; à Naiura Pereira, pelo apoio e pela constante alegria que muitas vezes me impulsionava a seguir adiante; à Roosecelis, pela ajuda no reprocessamento do material histológico; à Rosana Cardoso, pelo apoio na parte burocrática desse trabalho e ao Wellington Dantas, pelo incentivo.

À Dr^a. Fernanda Guedes Luiz, amiga de todas as horas, não só nas alegrias, mas como nas tristezas e nos momentos em que estamos sem forças para prosseguir e, são em momentos assim que reconhecemos os verdadeiros amigos. Agradeço pela ajuda em todas as fases desse trabalho e pela amizade sincera.

Ao Ronaldo Rago Campos, meu esposo amado, que soube respeitar e entender a minha ausência em muitos momentos nos quais a minha atenção estava somente voltada para um único foco: a tese.

Aos meus queridos pais, Ailor Fernandes e Rosely Raniero Fernandes, pelo apoio, carinho em todas as fases da minha vida e principalmente pelo exemplo de dignidade e respeito.

Ao meu irmão, Leandro Raniero Fernandes e a toda minha família pelo incentivo e torcida.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho e que por um lapso de memória não foram aqui citados, mas que até podem ser esquecidos momentaneamente pelo cérebro, mas não pelo coração.

*“Viva como se fosse morrer amanhã.
Aprenda como se fosse viver para sempre”.*

Mahatma Ghandi.

Esta tese esta de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	07
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1 Dados históricos da raiva.....	11
3.2 Etiologia do vírus da raiva.....	14
3.3 Epidemiologia da raiva.....	17
3.4 Vias de transmissão e ciclo do vírus da raiva.....	20
3.5 Formas, fases e manifestações clínicas da raiva.....	24
3.6 Diagnóstico da infecção rábica.....	27
3.7 Alterações macroscópicas e histopatológicas da raiva no SNC....	29
3.8 Barreira hematoencefálica e privilégio imune do SNC.....	30
3.9 Resposta imune do hospedeiro frente à infecção rábica.....	33
3.10 Papel da apoptose na infecção rábica.....	38
3.11 Mecanismos de escape do vírus da raiva.....	40
3.12 Medidas de controle da raiva.....	41
4. MÉTODOS.....	43
4.1 Casuística.....	44

4.1.1 Casos de infecção rábica.....	44
4.1.2 Casos-controle.....	45
4.2 Confirmação diagnóstica para infecção rábica e processamento do material.....	47
4.3 Avaliação histopatológica pela coloração de HE.....	48
4.4 Método imuno-histoquímico.....	49
4.4.1 Método imuno-histoquímico para citocinas.....	52
4.4.2 Reação imuno-histoquímica de dupla marcação.....	54
4.5 Características do anticorpo anti-raiva.....	56
4.6 Quantificação dos eventos.....	56
4.7 Western-blot e especificidade do anticorpo anti-raiva.....	57
4.8 Transcrição reversa seguida da cadeia de polimerase (RT-PCR). 59	
4.8.1 Desparafinização dos cortes com xilol.....	59
4.8.2 Desparafinização dos cortes com Tween 20.....	60
4.8.3 Métodos de extração de RNA viral.....	60
4.8.4 Transcrição reversa (RT).....	63
4.8.5 Amplificação do cDNA pela reação em cadeia da polimerase polimerase (PCR).....	64
4.8.6 Avaliação do resultado da amplificação.....	65
4.9 Análise estatística.....	67
5. RESULTADOS.....	68
5.1 Dados gerais dos pacientes.....	69
5.2 Avaliação histopatológica.....	69
5.3 Avaliação imuno-histoquímica.....	74

5.3.1	Expressão antigênica do vírus da raiva no SNC.....	74
5.3.2	Expressão do vírus da raiva em astrócitos e células endoteliais através de reação imuno-histoquímica de dupla marcação.....	78
5.3.3	Linfócitos TCD4+ por microambiente e região do SNC.....	79
5.3.4	Linfócitos TCD8+ por microambiente e região do SNC.....	81
5.3.5	Linfócitos B por microambiente e região do SNC.....	83
5.3.6	Células NK por microambiente e região do SNC.....	85
5.3.7	Macrófagos CD68+ por microambiente e região do SNC.....	87
5.3.8	Astrócitos por microambiente e região do SNC.....	89
5.3.9	Células expressando TNF- α por microambiente e região do SNC.....	91
5.3.10	Células expressando IFN- γ por microambiente e região do SNC.....	93
5.3.11	Células expressando TGF- β por microambiente e região do SNC.....	95
5.3.12	Células expressando IL-1 β por microambiente e região do SNC.....	97
5.3.13	Células expressando IL-2r por microambiente e região do SNC.....	99
5.3.14	Células expressando IL-4 por microambiente e região do SNC.....	101
5.3.15	Células expressando IL-6 por microambiente e região do SNC.....	103
5.3.16	Células expressando IL-10 por microambiente e região do SNC.....	105
5.3.17	Células expressando IL-12 por microambiente e região do SNC.....	107
5.3.18	Células expressando granzima por microambiente e região do SNC.....	109

5.3.19 Células expressando iNOS por microambiente e região do SNC.....	111
5.3.20 Apoptose por microambiente e região do SNC.....	113
5.3.21 Panorama geral do fenótipo das células na infecção rábica em comparação ao grupo controle.....	116
5.3.22 Panorama geral do fenótipo das citocinas na infecção rábica em comparação ao grupo controle.....	117
5.4 Western-blot.....	118
5.5 RT-PCR para o vírus da raiva em material parafinado.....	119
6. DISCUSSÃO.....	120
7. CONCLUSÕES.....	152
8. ANEXOS.....	158
Anexo A. Aprovação da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP.....	159
Anexo B. Raiva: contagem de células infectadas com vírus da raiva, células inflamatórias, células expressando citocinas e outros marcadores nos microambientes e regiões do SNC.....	160
Anexo C. Grupo controle: contagem células inflamatórias, células expressando citocinas e outros marcadores nos microambientes e regiões do SNC.....	170
Anexo D. Dados estatísticos das células imunomarcadas com o antígeno rábico, células inflamatórias, células expressando citocinas e outros marcadores nos microambientes e regiões do SNC.....	179
9. REFERÊNCIAS.....	220

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C.	antes de Cristo
APCs	células apresentadoras de antígeno
BBB	barreira hematoencefálica, do inglês "brain-blood barrier"
BSA	soro albumina-bovina
°C	grau Celsius
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CTL	linfócitos T citotóxicos
CVS	Challenge Virus Standard
DAB	Diaminobenzidina
DCs	células dendríticas
dNTPs	desoxinucleotídeos trifosfato
FasL	Fas ligante
GFAP	anti-glial fibrillary acid protein
HE	Hematoxilina-eosina
IFN-γ	interferon gama
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
iNOS	sintase óxido nítrico induzível
M	molar
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
mRNAs	RNA mensageiros
NCAM	molécula de adesão da célula neural
NK	células natural killer
μm	micrômetros

mm	milímetros
mL	mililitro
µL	microlitro
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PBS	phosphate buffered saline
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
SABC	complexo estreptavidina-biotina peroxidase
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SVOC	Serviço de Verificação de Óbito da Capital
TBE	tampão Tris/Borato/EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TGF-β	fator transformador do crescimento beta
Th1	linfócitos T auxiliares do tipo 1
Th2	linfócitos T auxiliares do tipo 2
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
Tris-EDTA	ácido acético diaminotetraetileno
Tris-HCL	ácido clorídrico diaminotetraetileno
Trizol	Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura das proteínas que compõem o vírus rábico.....	16
Figura 2. Esquema ilustrativo do genoma do vírus da raiva.....	17
Figura 3. Esquema ilustrativo da entrada do vírus da raiva no organismo e sua disseminação ao SNC e a outros órgãos.....	22
Figura 4. Etapas da interação do vírus da raiva com a célula hospedeira.....	23
Figura 5. Esquema ilustrativo da imunopatogenia experimental da raiva.....	37
Figura 6. Demonstração do método quantitativo utilizando-se o graticulo para contagem das células imuno-marcadas, com ocular de 10x e objetiva de 40x.....	57
Figure 7. Raiva: alterações histopatológicas pela coloração de HE.....	73
Figure 8. Raiva: reação imuno-histoquímica demonstrando antígeno da raiva.....	76
Figura 9. Reação imuno-histoquímica de dupla marcação.....	78
Figura 10. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para linfócitos TCD4+.....	79
Figura 11. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para linfócitos TCD8+.....	81
Figura 12. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para linfócitos B.....	83
Figura 13. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células NK.....	85
Figura 14. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para macrófagos CD68+.....	87
Figura 15. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para astrócitos.....	89
Figura 16. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando TNF- α	91

Figura 17. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IFN- γ	93
Figura 18. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando TGF- β	95
Figura 19. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-1 β	97
Figura 20. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-2r.....	99
Figura 21. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-4.....	101
Figura 22. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-6.....	103
Figura 23. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-10.....	105
Figura 24. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-12.....	107
Figura 25. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando granzima.....	109
Figura 26. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando iNOS.....	111
Figura 27. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células apoptóticas.....	113
Figura 28. Raiva: reação imuno-histoquímica de dupla marcação evidenciando linfócitos TCD4+ (A) e linfócitos TCD8+ (B) corados em marrom expressando caspase 3 (coloração vermelha).....	115
Figura 29. Reação de Western-blot.....	118
Figura 30. Reação de RT-PCR negativa para o vírus da raiva.....	119
Figura 31. Via hematogênica alternativa de disseminação neuronal pelo vírus da raiva.....	132
Figura 32. Esquema ilustrativo da imunopatogenia da raiva humana parálitica transmitida por morcegos.....	149

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Raiva: graus de alterações histopatológicas.....	71
Gráfico 2. Raiva: neurônios e células da glia imunomarcados com o vírus da raiva por mm ² no microambiente intraparenquimatoso.....	77
Gráfico 3. Raiva: neurônios e células da glia imunomarcados com o vírus da raiva por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	77
Gráfico 4. Raiva e grupo controle: linfócitos TCD4+ imunomarcados por mm ² nos três microambientes do SNC.....	80
Gráfico 5. Raiva e grupo controle: linfócitos TCD4+ imunomarcados por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	80
Gráfico 6. Raiva e grupo controle: linfócitos TCD8+ imunomarcados por mm ² nos três microambientes do SNC.....	82
Gráfico 7. Raiva e grupo controle: linfócitos TCD8+ imunomarcados por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	82
Gráfico 8. Raiva e grupo controle: linfócitos B imunomarcados por mm ² nos três microambientes do SNC.....	84
Gráfico 9. Raiva e grupo controle: linfócitos B imunomarcados por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	84
Gráfico 10. Raiva e grupo controle: células NK imunomarcadas por mm ² nos três microambientes do SNC.....	86
Gráfico 11. Raiva e grupo controle: células NK imunomarcadas por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	86
Gráfico 12. Raiva e grupo controle: macrófagos CD68+ imunomarcados por mm ² nos três microambientes do SNC.....	88
Gráfico 13. Raiva e grupo controle: macrófagos CD68+ imunomarcados por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	88
Gráfico 14. Raiva e grupo controle: astrócitos imunomarcados por mm ² no microambiente intraparenquimatoso.....	90

Gráfico 15. Raiva e grupo controle: astrócitos imunomarcados por mm^2 nas diferentes regiões do SNC.....	90
Gráfico 16. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando TNF- α por mm^2 nos três microambientes do SNC.....	92
Gráfico 17. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando TNF- α por mm^2 nas diferentes regiões do SNC.....	92
Gráfico 18. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IFN- γ por mm^2 nos três microambientes do SNC.....	94
Gráfico 19. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IFN- γ por mm^2 nas diferentes regiões do SNC.....	94
Gráfico 20. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando TGF- β por mm^2 nos três microambientes do SNC.....	96
Gráfico 21. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando TGF- β por mm^2 nas diferentes regiões do SNC.....	96
Gráfico 22. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-1 β por mm^2 nos três microambientes do SNC.....	98
Gráfico 23. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-1 β por mm^2 nas diferentes regiões do SNC.....	98
Gráfico 24. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-2r por mm^2 nos três microambientes do SNC.....	100
Gráfico 25. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-2r por mm^2 nas diferentes regiões do SNC.....	100
Gráfico 26. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-4 por mm^2 nos três microambientes do SNC.....	102
Gráfico 27. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-4 por mm^2 nas diferentes regiões do SNC.....	102
Gráfico 28. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-6 por mm^2 nos três microambientes do SNC.....	104
Gráfico 29. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-6 por mm^2 nas diferentes regiões do SNC.....	104
Gráfico 30. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-10 por mm^2 nos três microambientes do SNC.....	106

Gráfico 31. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-10 por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	106
Gráfico 32. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-12 por mm ² nos três microambientes do SNC.....	108
Gráfico 33. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-12 por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	108
Gráfico 34. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando granzima por mm ² nos três microambientes do SNC.....	110
Gráfico 35. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando granzima por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	110
Gráfico 36. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando iNOS por mm ² nos três microambientes do SNC.....	112
Gráfico 37. Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando iNOS por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	112
Gráfico 38. Raiva e grupo controle: células apoptóticas imunomarcadas por mm ² nos três microambientes do SNC.....	114
Gráfico 39. Raiva e grupo controle: células apoptóticas imunomarcadas por mm ² nas diferentes regiões do SNC.....	114
Gráfico 40. Raiva: neurônios apoptóticos e outras células apoptóticas por mm ² no SNC.....	115
Gráfico 41. Panorama do fenótipo celular na raiva e grupo controle no SNC.....	116
Gráfico 42. Panorama das citocinas na raiva e grupo controle no SNC.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Raiva: dados gerais dos pacientes.....	45
Tabela 2. Grupo controle: dados gerais dos pacientes.....	46
Tabela 3. Raiva: avaliação histopatológica semiquantitativa da coloração de HE.....	48
Tabela 4. Relação de anticorpos primários empregados em imunohistoquímica.....	53
Tabela 5. Raiva: oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizados nas reações de transcrição reversa (RT) e reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	66
Tabela 6. Raiva: avaliação histopatológica pela coloração de HE.....	70
Tabela 7. Raiva: comprometimento do microambiente meningeal.....	72

RESUMO

Fernandes ER. O processo inflamatório, a resposta imune “in situ” e a morte neuronal em sistema nervoso central de pacientes com raiva transmitida por morcegos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 247p.

A raiva é uma doença do sistema nervoso central que é quase invariavelmente fatal. Apesar de causar cerca de 60.000 mortes/ano, a raiva ainda permanece uma doença negligenciada na maioria dos países, principalmente naqueles em desenvolvimento. O objetivo do nosso estudo foi verificar nos microambientes meningeal, perivascular e intraparenquimatoso do sistema nervoso central, o processo inflamatório, a resposta imune do hospedeiro e a morte dos neurônios frente à infecção rábica transmitida por morcegos. Verificamos que a raiva humana transmitida por morcegos é uma meningoencefalomielite. Através de reação imuno-histoquímica caracterizamos e quantificamos “in situ” a distribuição do antígeno viral, o fenótipo de células inflamatórias, as células expressando citocinas pró inflamatórias, citocinas representativas de padrão Th1 e Th2 e células em apoptose. O antígeno viral foi encontrado difusamente no parênquima cerebral, em maior abundância em neurônios, não diferindo sua distribuição em relação as regiões cerebrais. As células da glia, em especial os astrócitos, estavam imunomarcadas com o antígeno da raiva, assim como as células endoteliais e células mononucleadas da luz vascular. Esses achados contribuíram para a hipótese da ocorrência de uma via hematogênica alternativa de disseminação viral, através da infecção de células endoteliais pelo vírus, posterior infecção de astrócitos e finalmente infecção de neurônios. A expressão significativa de IL-12 nos pacientes rábicos provavelmente traduz imunidade de base preservada. Identificamos, outrossim, falta de resposta efetiva das células NK e comprometimento da resposta imune adaptativa seqüencial, demonstrada pela depleção de linfócitos TCD4+ no parênquima cerebral, prejuízo da atividade citotóxica dos linfócitos TCD8+ com proporcionalmente baixa expressão de granzima e expressão rarefeita de IFN- γ e IL-2r. Essa situação deve ser reflexo da manipulação do vírus sobre a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro tendo como consequência uma resposta ineficaz para clareamento do vírus. A expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) contribuiu para o dano neuronal. O padrão citocínico predominante no sistema nervoso central na raiva foi o Th2, com alta expressão de IL-4 e IL-10. O TGF- β aumentado nos casos de raiva favorece um ambiente imunossupressor para manter intacta a rede neuronal, mas também contribui para permanência local do vírus. A verificação de grau pouco acentuado de neurônios apoptóticos em contraposição a apoptose expressiva de linfócitos TCD4+ e TCD8+, indicaria a utilização pelo vírus de mecanismos ora anti-apoptóticos para preservar neurônios e favorecer a disseminação viral, ora pró-apoptóticos, destruindo linfócitos e atenuando o

processo inflamatório. Em síntese, o envolvimento do sistema nervoso central em decorrência da raiva se faz às custas de processo inflamatório com predomínio local de linfócitos TCD8+, um padrão Th2 de expressão de citocinas, acometendo os microambientes meningeal, perivascular e intraparenquimatoso, sendo o bulbo a região mais afetada pelo processo.

Descritores: 1. Raiva; 2. Sistema nervoso central; 3. Inflamação; 4. Imunoistoquímica; 5. Quirópteros.

SUMMARY

Fernandes ER. Inflammatory process, “in situ” immune response and neuronal death in central nervous system of patients with rabies transmitted by bats [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2009. 247p.

Viral disease of central nervous system almost invariable fatal, rabies causes about 60.000 deaths yearly, and still remain a neglected disease in most countries, specially in developing ones. We study the meningeal, perivascular and parenchymal environment in central nervous system from patients who dies after bat transmitted rabies, looking for the inflammatory process, host immune response and neuronal death. We show that human rabies transmitted by bats is a meningoencephalomyelitis. Immunohistochemistry allows the “in situ” quantification of viral antigen distribution, inflammatory cellular phenotype, expression of cytokines representing both Th1 and Th2 profile and pro-inflammatory and cell apoptosis. Viral antigen was found disseminated in cerebral parenchyma, more abundant in neurons, without cerebral area preference. Glial cells, specially astrocytes, were immunostained with rabies antigen, as well as endothelial and vascular mononuclear cells. These findings contributed for an alternative hypothesis of the occurrence of hematogenic viral dissemination, through viral infection or passage by endothelial cells, followed by astrocyte infection, and finally reaching neurons. IL-12 significant expression in central nervous system from rabies patients probably reflect preservation of immunity. The lack of effective NK cells could compromise adaptive immune response, demonstrated by TCD4⁺ lymphocytes depletion in cerebral parenchyma, ineffective TCD8⁺ cytotoxic activity with low granzyme expression and low expression of IFN- γ and IL-2r. This situation reflects viral effect on host innate and adaptive immune response leading to an ineffective response for viral clearance. High pro-inflammatory cytokine expression, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , contribute for neuronal damage, with predominant Th2 cytokine profile in central nervous system in rabies patients, with high expression of IL-4 and IL-10. Increased TGF- β expression also shows an immune suppressor environment, which maintains the neuronal network intact, but also contributes for viral permanence. The low degree of apoptotic neurons opposed with expressive apoptosis of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes, could indicate viral mechanisms anti-apoptotic for neurons preservation and favour viral dissemination, or pro-apoptotic, destroying lymphocytes and attenuating the inflammatory process. In synthesis, the involvement of central nervous system in rabies is consequence of inflammatory process with TCD8⁺ lymphocytes predominance, Th2 profile cytokines expression, affecting all brain compartments and areas, especially the medulla oblongata.

Descriptors: 1. Rabies; 2. Central nervous system; 3. Inflammation; 4. Immunohistochemistry; 5. Chiroptera.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença do Sistema Nervoso Central (SNC) que é quase invariavelmente fatal (Willoughby et al., 2005). É a décima doença infecciosa mais comum no mundo (Dietzschold et al., 2005), causando aproximadamente 60.000 mortes/ano, sendo a maioria delas em crianças da Ásia e África (Belotto et al., 2005). Contudo, a raiva ainda permanece uma doença negligenciada na maioria dos países, principalmente naqueles em desenvolvimento (Fooks, 2005), ocupando um lugar de baixa prioridade em relação a outras doenças como a aids e a tuberculose na classificação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002).

Segundo Rupprecht et al. (2002) a cada 15 minutos morre uma pessoa de raiva no mundo e mais 300 outras são expostas ao agente.

O agente etiológico da raiva é um vírus RNA de fita simples negativa, não segmentada, que pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e ao gênero *Lyssavirus* (Lyles e Rupprecht, 2007). Infecta primariamente os neurônios (Jogai et al., 2000), mas alguns estudos também têm demonstrado antígenos da raiva em astrócitos humanos (Nuovo et al., 2005) e em astrócitos e células microgliais murinas (Ray et al., 1997).

Vários mamíferos em diferentes partes do mundo servem como hospedeiro do vírus da raiva, sendo esse vírus isolado de praticamente todas as ordens desses animais. O cão é o maior reservatório e vetor,

transmitindo principalmente a raiva urbana, sendo esse animal responsável por 35.000 mortes a cada ano (Rupprecht et al., 2002).

Nos animais infectados o vírus da raiva encontra-se amplamente distribuído, não somente no sistema nervoso, mais também sendo detectado na saliva, urina, linfa, leite e sangue (Brooks et al., 2000).

A recuperação dos animais infectados é rara, entretanto, anticorpos contra raiva foram detectados em espécies vetoras aparentemente saudáveis, incluindo guaxinins, raposas, hienas, morcegos e cães domésticos na Etiópia. Os morcegos vampiros (*Desmodus rotundus*) podem transmitir o vírus da raiva durante meses, sem que tenham quaisquer sinais da doença, pois o vírus tornou-se peculiarmente adaptado às glândulas salivares desses animais (Warrell e Warrell, 2004).

Nos últimos dez anos, o aumento da detecção de casos de raiva em outros mamíferos, como morcegos, cães silvestres e sagüis e a identificação de novas variantes virais, vêm apontando para uma mudança no perfil epidemiológico da raiva no nosso país, com a caracterização dos ciclos aéreo e terrestre silvestre, além dos ciclos urbano e rural (Brasil, 2004).

No que diz respeito à transmissão do vírus, essa ocorre mediante a mordedura, arranhadura ou lambedura de um animal rábico (Hemachudha et al., 2002).

Do ponto de vista clínico a raiva apresenta-se sob dois diferentes aspectos: a raiva furiosa e a raiva parálitica. Ambas diferem em relação à sintomatologia, ao período de morbidade e a fatores imunológicos (Hemachudha et al., 1988; Smith et al., 1991; Queiroz, 1999). Apresentações

atípicas são vistas em casos raros de sobreviventes à infecção rábica (Fuerst, 1966; Willoughby et al., 2005).

Em relação à análise macroscópica, o cérebro infectado pelo vírus rábico pode apresentar edema e hiperemia difusa, mas às vezes as alterações são discretas, em contraste ao quadro clínico grave (Assis e Rosemberg, 1984).

Ao exame microscópico, as alterações inflamatórias predominam no tronco cerebral, medula espinal e gânglios sensitivos, observando-se infiltrado inflamatório perivascular, nódulos gliais, necrose de neurônios e neuronofagia (Assis e Rosemberg, 1984) e apoptose. Há muitas discussões em relação ao papel da apoptose na infecção rábica. Galelli et al. (2000) propõem que a apoptose é a principal causa de morte neuronal na infecção, sendo causada devido à indução da resposta imune T-dependente e não devido ao efeito deletério direto do vírus. Outros trabalhos sugerem que a apoptose constituiria um dos mais importantes mecanismos de defesa contra o vírus, levando a despolimerização dos filamentos de actina, a qual na raiva pode impedir o transporte da proteína do nucleocapsídeo viral e a disseminação neuronal do vírus (Dietzschold et al., 2001; Yan et al., 2002).

A alteração patognomônica da raiva é a presença do corpúsculo de Negri, uma inclusão viral citoplasmática, ovalada, eosinofílica, encontrada em neurônios de diferentes regiões do SNC (Queiroz, 1999).

Durante a infecção rábica a imunidade celular pode alterar o curso e as manifestações clínicas da doença. Lafon (2005) descreve em modelo experimental que a proteção contra o vírus da raiva é conferida pelos

linfócitos TCD4+, pois a encefalopatogenia fatal só ocorre após a depleção dessas células e não após depleção de linfócitos TCD8+.

De acordo Camelo et al. (2000), a morbidade (perda de peso e paralisia) e a mortalidade de camundongos infectados com o vírus rábico estão associadas à propagação viral, à produção de citocinas, à indução de apoptose e ao infiltrado de células inflamatórias.

No Brasil nas últimas décadas, houve uma redução significativa no número de casos de raiva humana registrados por ano, caindo de 173 na década de 80 para 3 casos em 2008, tendo o cão como principal transmissor seguido pelo morcego (Brasil, 2009a). Apesar dessa redução no número de casos, a raiva ainda é de grande importância na saúde pública por apresentar 100% de letalidade, com raras exceções (Willoughby et al., 2005).

A raiva ainda permanece um verdadeiro enigma no século XXI e os mecanismos patogênicos que determinam a doença ainda não estão bem esclarecidos, apesar dos progressos das pesquisas visando principalmente à prevenção.

Desconhecemos estudos que caracterizem e avaliem o fenótipo das células inflamatórias “in situ” no SNC e também a expressão tecidual de citocinas e a correlação desses eventos com as alterações histológicas nos ambientes meningeal, perivascular e intraparequimatoso.

Desta forma, julgamos de suma importância um estudo “in situ” do processo inflamatório que ocorre no SNC de pacientes falecidos em decorrência da infecção rábica, correlacionando os achados histopatológicos

e a resposta imune local com os relatos já descritos em estudos experimentais.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar no local de ação, o processo inflamatório desencadeado pelo vírus da raiva humana transmitida pelo morcego, analisando os microambientes meningeal, perivascular e intraparenquimatoso e regiões específicas do sistema nervoso central.

Como objetivos específicos pretendemos:

- Revisitar os eventos histopatológicos no sistema nervoso central na infecção rábica.
- Determinar o perfil fenotípico das células inflamatórias.
- Determinar a expressão de citocinas pro-inflamatórias, perfil Th1 e Th2 e a expressão de enzimas produtoras de radicais livres por células inflamatórias.

-
-
- Detectar por reação imuno-histoquímica a presença e localização de antígenos do vírus da raiva e sua relação com a inflamação e as alterações degenerativas dos neurônios.

 - Estudar os mecanismos de morte neuronal induzida pelo vírus ou resposta imune, em especial os relacionados a apoptose.

REVISÃO DA LITERATURA

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Dados históricos da raiva

A raiva é uma das doenças infecciosas mais antigas relacionada em parte com a ascensão da civilização, o crescimento das cidades e a domesticação e movimentação de animais (Rupprecht et al., 2002).

As primeiras referências conhecidas que citam a raiva datam do século X a.C. Relatos das conseqüências depois de mordidas de cães furiosos são encontrados em escritos da Mesopotâmia e do Egito milhares de anos atrás, havendo referência a um código denominado “Eshnunna”, o qual mencionava: “se um cão raivoso morder um homem e causar sua morte, o proprietário desse cão deverá pagar uma multa” (Hinrichsen et al., 2005).

Mesmo sem a confirmação de uma estrutura de doença infecciosa, praticamente nenhuma doença grave havia sido até então, associada casualmente com a mordida de um animal raivoso, levando à morte após inconfundíveis manifestações de fúria. A tendência à violência ou fúria fornece a origem básica para caracterizar o termo *raiva* usado para denominar a doença (Rupprecht et al., 2002).

Textos da medicina chinesa (cerca de 500 a.C.) e indiana (cerca de 100 a.C.) descrevem o que parece ser hidrofobia. A raiva em cão foi descrita por Demócrito (500 a.C.). Aristóteles (322 a.C.) demonstrou que cães sadios

mordidos por um cão raivoso ficavam doentes. Galeno (200 a.C.) recomendava a excisão das feridas causadas pela mordedura de um cão raivoso como forma de prevenir o desenvolvimento da doença (Instituto Pasteur, 2002).

De acordo com Hinrichsen et al. (2005), no oeste da Europa, a raiva era prevalente nos lobos desde 1271. A primeira epizootia relatada entre cães domésticos de centros urbanos ocorreu na Itália em 1708. Zinke em 1804 reproduziu a transmissão da raiva de um cão raivoso para um cão sadio, pela inoculação de saliva do animal infectado.

Pasteur conseguiu isolar o vírus em 1881, inoculando coelhos por via intracerebral, tendo preparado a primeira vacina anti-rábica usando medulas dissecadas de coelhos que tinham sido inoculadas por vírus fixo (cepas do vírus rábico atenuadas, desenvolvidas em laboratório), obtido por ele em 1884.

Em 1911, Semple introduz a vacina atenuada por passagens sucessivas no sistema nervoso de carneiros adultos, sendo essa vacina substituída em 1950 pela avianizada desenvolvida por Powell e Culbertson. Ambas vacinas, a Semple, por introduzir acidentes neurológicos, e a de Powell e Culbertson, pela menor eficácia imunológica, foram substituídas em 1955 pela Fuenzalida-Palacios, obtida em cérebro de camundongos recém-natos.

Em 1964, Kissiling propagou o vírus em células diplóides humanas, propiciando um novo tipo de vacina mais imunogênica. Em 1969, foi iniciada a imunização passiva com gamaglobulina hiperimune humana.

Na década de 80, pesquisadores do Instituto Wistar e do Centro de Biotecnologia em Strasbourg, França, elaboraram a vacina recombinante (Instituto Pasteur, 2002).

Atualmente, no Brasil, é utilizada uma vacina produzida em células “Vero”, retiradas dos rins do macaco-verde-africano (*Cercopithecus aethiops*), importada e produzida pela Aventis Pasteur AS, Lyon, França. Essa vacina contém vírus rábico inativado cepa WISTAR PM/WI 38-1503-3M, sendo embalada e distribuída pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Contudo, pesquisadores brasileiros do Instituto Butantan já produziram uma vacina nacional extremamente eficaz, também produzida a partir do cultivo do vírus rábico em células “Vero”, que se encontra em fase de aprovação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (Frazatti-Gallina et al., 2004).

Em 1903, Negri descreve o corpúsculo de inclusão em células do cérebro de animais raivosos. Remlinger, em 1903, e Barrat, em 1904, demonstram o agente como partícula ultra-microscópica (Hinrichsen et al., 2005).

Em 1958, Goldwasser e Kissling realizam o diagnóstico da raiva por imunofluorescência direta (Instituto Pasteur, 2002).

Em 1962, Matsumoto confirma o vírus em microscopia eletrônica e, em 1963 esse vírus foi incluído na família *Rhabdoviridae* (Hinrichsen et al., 2005).

3.2 Etiologia do vírus da raiva

O agente etiológico da raiva é um vírus RNA de fita simples negativa ($3' \rightarrow 5'$), não segmentada, que pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e ao gênero *Lyssavirus* (Lyles e Rupprecht, 2007).

O gênero *Lyssavirus* pode ser dividido em sete genótipos baseados nas seqüências do gene da proteína N ou no gene que codifica a glicoproteína transmembranosa. Os sete genótipos encontram-se dentro de dois filogrupos distintos. O filogrupo I compreende o genótipo 1 (vírus da raiva clássica), genótipo 5 (*European bat Lyssavirus 1* - EBL1), genótipo 6 (*European bat Lyssavirus* - EBL2), genótipo 4 (*Duvehage virus*) e genótipo 7 (*Australian bat Lyssavirus* - ABL), enquanto que o Filogrupo II compreende os genótipos africanos 2 (*Lagos bat virus*) e 3 (*Mokola virus*) (Badrane et al., 2001).

Quatro novas variantes, além dos sete genótipos, foram propostas como membros do gênero *Lyssavirus*: *Aravan Virus* (AV), isolado de um morcego insetívoro (*Myotis blythi*), em 1991, na região do Kyrgyzstan, Ásia Central (Arai et al., 2003; Kuzmin et al., 2003); *Khujand Virus* (KV), isolado de um morcego insetívoro (*Myotis mystacinus*), em 2001, na região do Tajikistan, Ásia Central; *Irkut Virus* (IV), isolado de um morcego insetívoro (*Murina leucogaster*), em 2002, na cidade de Irkutsk, Sibéria e *West Caucasian Bat Virus* (WCBV), isolado de um morcego insetívoro (*Miniopterus schreibersi*), em 2002, na Rússia (Botvinkin et al., 2003).

O vírus da raiva apresenta uma estrutura em forma de projétil que mede cerca de 75nm por 180nm. É um vírus termolábil, sobrevivendo por quatro horas a temperatura de 40 °C, 35 segundos a 60 °C e é estável por vários dias a temperatura de 4 °C. O vírus pode ser inativado em soluções com valores de pH abaixo de 4 e acima de 10, agentes oxidantes, solventes orgânicos, detergentes, enzimas proteolíticas, raios-X e radiação ultravioleta (Instituto Pasteur, 2002).

As partículas virais são circundadas por um envoltório membranoso dotado de espículas protuberantes com 10nm de comprimento. Os peplômeros (espículas) são constituídos de trímeros da glicoproteína G viral. No interior do envoltório existe um ribonucleocapsídeo. Dois elementos estruturais principais constituem o vírus rábico: a ribonucleoproteína (RNP) e o envelope viral, derivado de células hospedeiras durante o brotamento e composto por uma bicamada lipídica, a qual envolve a RNP (Figura 1). A organização básica do vírus rábico é simples quando comparada a outros vírus (Brooks et al., 2000).

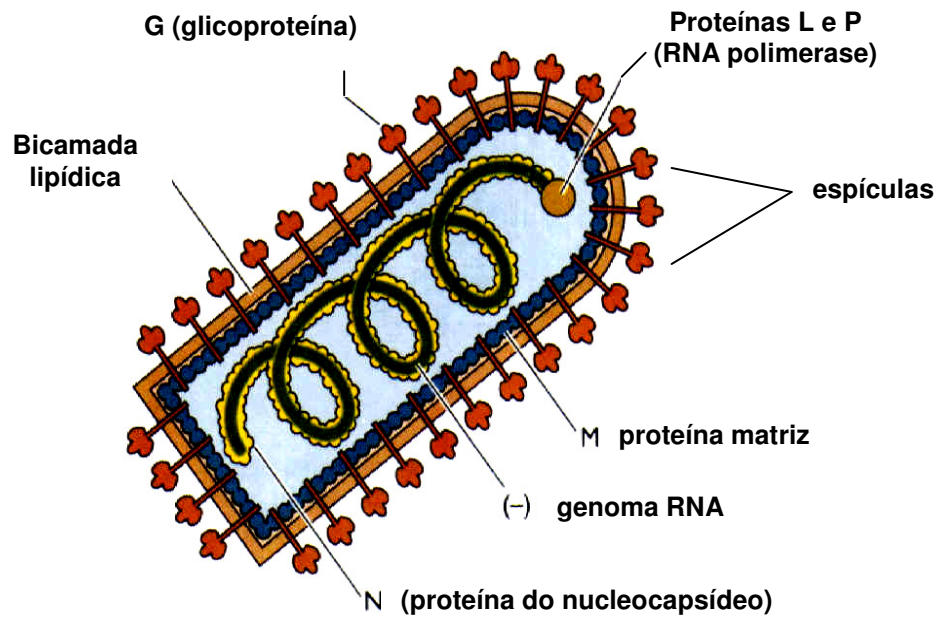
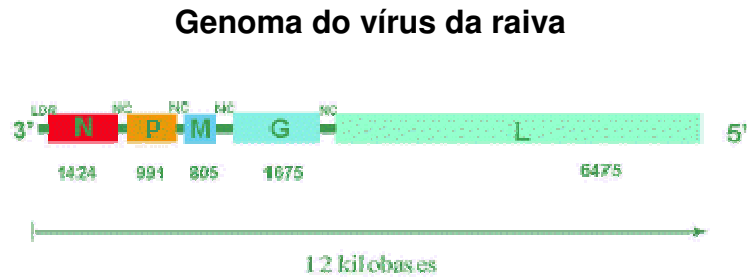


Figura 1. Esquema da estrutura das proteínas que compõem o vírus rábico

O genoma completo do vírus é composto por cerca 11932 pb e apresenta cinco genes relacionados a cinco proteínas virais: o **gene N** (1424 pb) codifica para uma nucleoproteína que encapsula o RNA viral; o **gene P** (991 pb) produz uma fosfoproteína, a qual é importante não somente na transcrição e replicação, mas também para interações com componentes protéicos celulares durante transporte axoplasmático; o **gene M** (805 pb) codifica para uma proteína matriz e interliga o envelope ao nucleocapsídeo; o **gene G** (1675 pb) produz uma glicoproteína simples que media a recepção e a fusão na superfície da célula do hospedeiro e serve como um alvo para indução de anticorpos neutralizantes virais; e o **gene L** (6475 pb) que codifica uma polimerase para síntese de RNA (Figura 2). Em torno de 9% do genoma viral são áreas não transcritas (Finke e Conzelmann, 2005).



Fonte: Center for Disease control and Prevention (CDC): <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies>

Figura 2. Esquema ilustrativo do genoma do vírus da raiva

3.3 Epidemiologia da raiva

A distribuição da raiva é mundial, com cerca de 40.000 a 70.000 mortes ao ano, a maioria em países em desenvolvimento. Existem, todavia, países ou territórios livres da doença, onde a população animal não se encontra infectada com o vírus, como por exemplo, Nova Zelândia, Nova Guiné, Japão, Hawai, Taiwan, Oceania, Finlândia, Suécia, Portugal, Grécia, algumas ilhas das Antilhas e do Atlântico (Brasil, 2008).

A maioria dos casos de raiva ocorre na Ásia e na África, acometendo principalmente crianças. Na Ásia, ocorrem de 30 a 55 mil casos humanos de raiva anualmente, sendo que cerca de sete milhões de indivíduos recebem tratamento contra a doença. Na África, o número de tratamentos profiláticos anuais é de aproximadamente 500 mil, e o número estimado de óbitos é de cinco a 15 mil ao ano. Na Europa e América do Norte, os casos não chegam a 50 por ano e o número de tratamentos atinge 100 mil. Na América Latina,

estima-se que a média de casos de raiva humana é de 40 por ano e o número de tratamentos é de 500 mil (Belotto et al., 2005).

Vários mamíferos servem como hospedeiro em diferentes partes do mundo, sendo o vírus isolado de praticamente todas as ordens desses animais. O cão é o maior reservatório e vetor, transmitindo principalmente a raiva urbana, sendo esse animal responsável por 35.000 mortes a cada ano (Rupprecht et al., 2002).

Nos animais infectados os vírus encontram-se amplamente distribuídos, não somente no sistema nervoso, mas são também detectados em saliva, urina, linfa, leite e sangue (Brooks et al., 2000).

A recuperação dos animais infectados é rara, entretanto, anticorpos contra raiva foram detectados em espécies vetoras aparentemente saudáveis, incluindo guaxinins, raposas, hienas, morcegos e cães domésticos na Etiópia. Os morcegos vampiros podem transmitir o vírus durante meses sem que tenham quaisquer sinais da doença, pois o vírus tornou-se peculiarmente adaptado às glândulas salivares desses animais (Warrell e Warrell, 2004).

Em países endêmicos a raiva é mantida em nichos ecológicos inter-relacionados: um urbano, cuja transmissão se faz por cães e gatos e um selvagem, no qual as espécies animais variam de acordo com as regiões do mundo. O mais importante reservatório de raiva na Europa é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), responsável por mais de 75% dos casos de raiva. Na América do Norte, a raiva por cão urbano é rara, mas a raiva selvagem associada a morcegos, guaxinins (*Procyon lotor*), gambás malhados

(*Spilogale gracilis*) e listrados (*Mephitis mephitis*), raposa cinza (*Urocyon cinereoargenteus*) é a preponderante. Na América do Sul, a raiva está associada a cães e morcegos vampiros (*Desmodus rotundus*). Os morcegos insetívoros têm sido relatados como abrigando viroses relacionadas à raiva, mas o papel deles na disseminação da doença para o homem é acidental (Favi et al., 2002; De Serres et al., 2008). Outros animais de vida livre podem ser importantes em outras partes do mundo, como o chacal (*Canis adustus* e *Canis mesomelas*) e mongooses (*Suricata suricata*) que são conhecidos por serem importantes reservatórios e vetores de raiva na África do Sul (Woldehiwet, 2005).

No Brasil, os casos de raiva humana vêm decaindo com o passar dos anos, isso devido a campanhas eficazes de vacinação de animais domésticos (Grisi-Filho et al., 2008). Contudo, o aumento de detecção de casos de raiva em outros mamíferos, como morcegos, cães silvestres, sagüis e a identificação de novas variantes virais vêm apontando para uma mudança no perfil epidemiológico da raiva em nosso país, com a caracterização dos ciclos aéreo e terrestre-silvestre (Brasil, 2004). Esse fato pode acarretar surtos de raiva humana, como os ocorridos nos anos de 2004 e 2005 nos Estado do Pará (da Rosa et al., 2006) e em outros Estados do Nordeste (Gonçalves et al., 2002).

As médias anuais de casos de raiva humana notificados no Brasil vêm apresentando uma oscilação, sendo 10 casos em 2002, 17 em 2003, 30 em 2004 e 44 em 2005. Até 2003, o cão era a principal espécie transmissora, sendo que a partir de 2004, os morcegos hematófagos tornaram-se os

principais transmissores no Brasil e na América Latina. De 1986 a 2006 foram registrados no Brasil 758 casos de raiva humana, transmitida por diferentes espécies animais, não só por morcegos. Em 2007, tivemos apenas um caso de raiva humana decorrente da mordida de um cão e em 2008 foram três casos humanos, um provocado por mordida de sagüi e dois casos por morcegos (Brasil, 2009a).

O perfil epidemiológico da raiva no Estado de São Paulo também sofreu uma mudança devido à diminuição de casos de raiva em cães e um aumento do número de casos de raiva em morcegos, o que conseqüentemente refletiu na disseminação do vírus em herbívoros e outros animais domésticos. O constante isolamento da variante 3 (*Desmodus rotundus*), através de estudos antigênicos das amostras isoladas de cães, gatos, herbívoros e outras espécies de 35 morcegos, confirma a presença do morcego hematófago em áreas urbanas e a circulação do vírus no ciclo aéreo (Carrieri et al., 2001).

3.4 Vias de transmissão e ciclo do vírus da raiva

O vírus da raiva é um patógeno bem adaptado ao SNC, onde infecta preferencialmente os neurônios (Jogai et al., 2000). Alguns estudos têm demonstrado antígenos da raiva em astrócitos humanos (Nuovo et al., 2005) e em astrócitos e células microgliais murinas (Ray et al., 1997). A presença do antígeno viral em células endoteliais também foi demonstrada por Fekadu et al. (1988).

No que diz respeito à transmissão do vírus, essa ocorre mediante a mordedura, arranhadura e/ou lambedura de um animal rábico. Uma forma mais rara de infecção pode ocorrer mediante a inalação de vírus aerossolizados em cavernas habitadas por morcegos raivosos e em acidentes de laboratório com partículas aerossolizadas de tecidos infectados (Hemachudha et al., 2002). A transmissão homem a homem através de órgãos transplantados tem sido bem documentada (Dietzschold e Koprowski, 2004; Burton et al., 2005; Klintmalm et al., 2005; Srinivasan et al., 2005).

A transmissão eficiente depende da quantidade de vírus presente na saliva do animal infectado e particularmente da gravidade da mordida, principalmente se esta alcança o tecido muscular onde há alta densidade de receptor de acetilcolina (Jackson, 2002).

Após a sua inserção na pele o vírus da raiva se liga aos receptores de acetilcolina na junção neuromuscular, multiplica-se em fibras musculares (período de incubação) e penetra em terminações nervosas sensitivas (Lentz et al., 1982). Uma vez no sistema nervoso periférico (SNP), o vírus é transportado aos gânglios sensitivos por transporte axonal retrógrado (cerca de 50 a 100 mm por dia) até alcançar o próximo corpo celular neuronal e de modo centrípeto o SNC (Kucera et al., 1985; Tsiang et al., 1991). O vírus rábico pode também se propagar centrifugamente a terminações sensitivas da córnea (Awasthi et al., 2001), aos folículos pilosos, glândulas salivares (de onde é excretado na saliva) e às vísceras (Queiroz, 1999), inclusive o coração, onde pode causar miocardite (Araujo et al., 1971) (Figura 3).

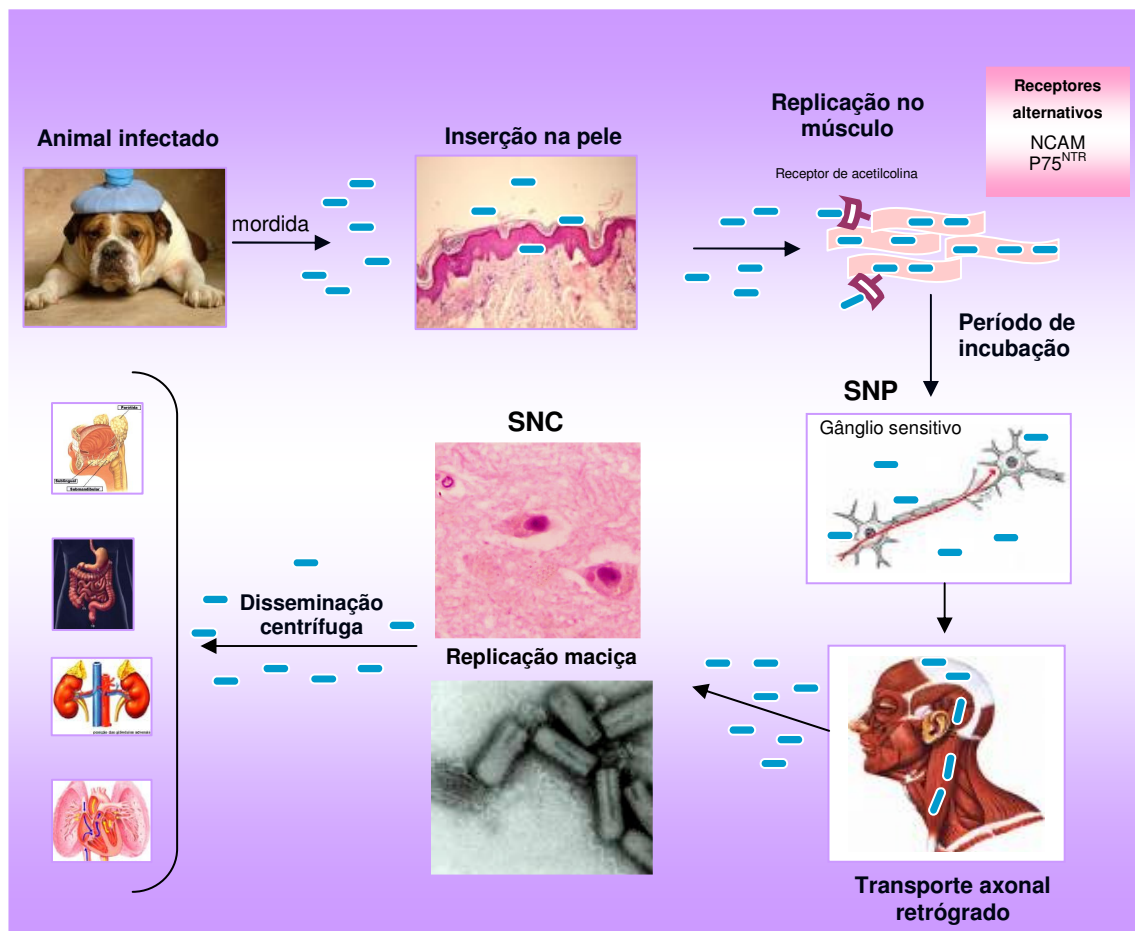


Figura 3. Esquema ilustrativo da entrada do vírus da raiva no organismo até sua disseminação ao SNC e demais outros órgãos

Quando o vírus rábico atinge a célula alvo inicia uma série de modificações para que ele possa utilizar a maquinaria da célula e desse modo replicar-se. As etapas da interação do vírus com a célula hospedeira são: a **adesão**, onde o vírion se liga aos receptores na célula hospedeira; a **penetração**, que caracteriza a entrada do vírus na célula; o desenvolvimento, onde há a remoção do envelope viral; a **transcrição**, quando ocorre a síntese de mRNAs; a **translação**, onde há a síntese das cinco proteínas estruturais do vírus; o **processamento**, no qual se dá a

glicosilação da proteína G do vírus; a **replicação**, que é a etapa de produção do RNA genômico; a **montagem**, onde acontece a reunião de todas as estruturas virais e finalmente o **brotamento**, onde vírions completos deixam a célula hospedeira e estão prontos para infectarem outras células (Rupprecht et al., 2002) (Figura 4).

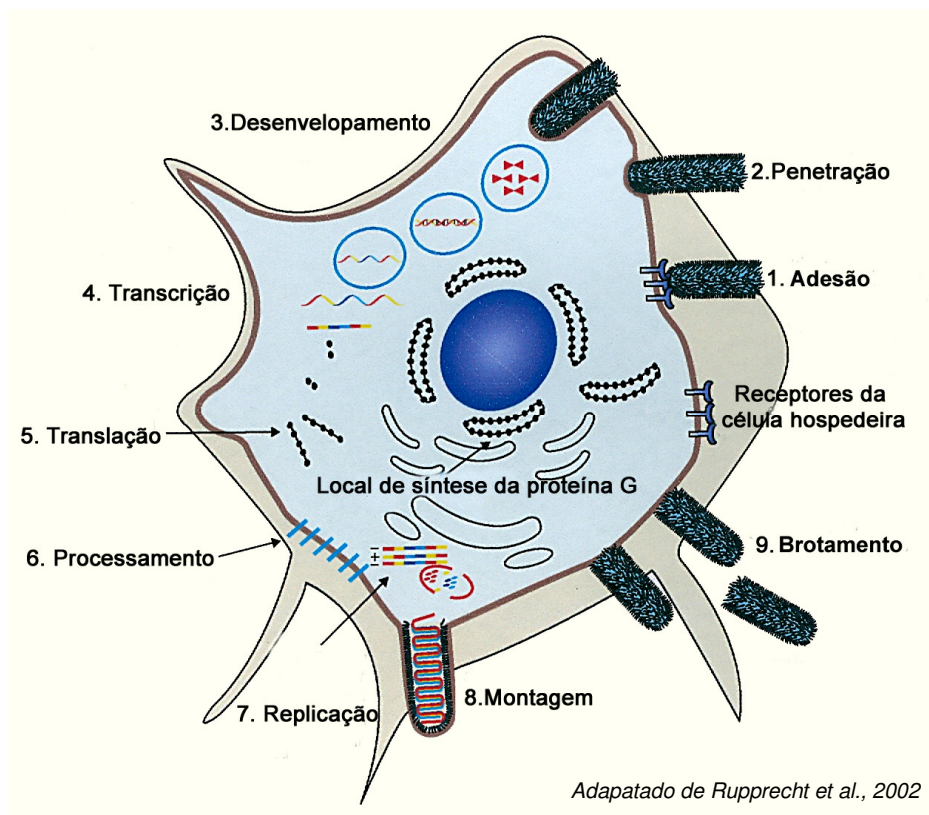


Figura 4. Etapas da interação do vírus da raiva com a célula hospedeira

Outros dois prováveis receptores responsáveis pela interação do vírus da raiva com a célula hospedeira têm sido descritos na literatura: a molécula de adesão da célula neural (NCAM, do inglês “neural cell adhesion molecule”) (Thoulouze et al., 1998) e o receptor neurotrófico p75 (Tuffereau

et al., 1998). A NCAM é expressa em três isoformas principais e está presente no músculo adulto e em junções neuromusculares (Moscoso et al., 1998). Pesquisadores têm investigado a real importância do receptor neurotrófico p75 na patogenia da raiva (Langevin et al., 2002).

Estudo em animais experimentais com a utilização de cepas do vírus fixo da raiva indica que o vírus da raiva é capaz de entrar direto nos nervos periféricos, sem a necessidade de um ciclo replicativo em células extraneurais e isso estaria associado a um período de incubação mais curto (Shankar et al., 1991).

Uma indagação que persiste é se existem outras vias alternativas de transmissão do vírus da raiva?

3.5 Formas, fases e manifestações clínicas da raiva

Em países onde a raiva urbana é endêmica, a familiaridade com os sintomas clínicos é importante para o diagnóstico de raiva em seres humanos, cães, gatos e outros animais. O tempo entre a exposição ao vírus e os primeiros sinais clínicos podem variar de poucos dias a meses, às vezes até anos (Brasil, 2008).

Devido à diversidade clínica, durante a fase neurológica aguda, a raiva pode ser distinguida como: clássica (em suas formas encefalítica ou furiosa e paralítica ou muda) ou não clássica (Hemachudha et al., 2002).

A raiva clássica é quase sempre associada ao vírus da raiva verdadeira (genótipo 1). Padrões de raiva não-clássica podem ser

encontrados em pacientes expostos a morcegos e também observados em apresentações atípicas em casos raros de sobreviventes (Fuerst, 1966; Hemachudha et al., 2002; Warrell e Warrell, 2004; Willoughby et al., 2005).

Em geral a doença clínica pode ser dividida em cinco fases: incubação, prodrômica, neurológica aguda, coma e morte (Hankins e Rosekrans, 2004).

A média do período de incubação é de um a dois meses, mas pode durar menos que sete dias ou ainda, mais que seis anos. O período de incubação é amplamente influenciado pelo local da mordida. Mordidas na cabeça e outras áreas com intensa inervação, como face, pescoço e mãos, particularmente com sangramento, carregam alto risco e são geralmente associadas com período de incubação curto. A gravidade do ferimento, virulência do vírus e resistência do hospedeiro também influenciam no período de incubação (Smith et al., 1991).

A fase prodrômica inicia-se quando o vírus move-se centriptamente da periferia para o gânglio da raiz dorsal e para o SNC, estendendo-se por poucos dias, geralmente não mais que uma semana. Essa fase marca o fim do período de incubação e a maioria dos pacientes morre dentro de duas semanas. Nessa fase os sintomas são vagos, variáveis e não-específicos, tais como: perda do apetite, dor de cabeça, dores gerais com sintomas semelhantes a uma gripe. Esses sintomas iniciais são de difícil diferenciação de outras doenças, mas a história de exposição a um animal rábico é uma consideração importante a ser feita (Hemachudha et al., 2002).

Na fase neurológica aguda são descritos dores neuropáticas no local da mordida: como queimação, paralisia, formigamento, coceiras e prurido, sendo esses sintomas mais comumente vistos em infecções causadas por morcegos. As vítimas podem também sofrer de insônia e ansiedade. A fúria pode ocorrer, porém é rara em seres humanos. Durante a fase neurológica aguda, a vítima desenvolve sinais de hidrofobia, aerofobia e irritabilidade geral (Hemachudha et al., 2002).

Na forma paralítica da doença, quando não são observados os sinais clássicos de hidrofobia e aerofobia se faz necessário o diagnóstico diferencial com outras condições como a Síndrome de Guillain-Barré. A forma furiosa e a forma paralítica também diferem no período de morbidade e em relação a fatores imunológicos. A maioria dos pacientes com a forma furiosa morre dentro de sete dias, enquanto que na raiva paralítica, isso ocorre em cerca de duas semanas (Hankins e Rosekrans, 2004).

Um estudo histopatológico realizado em onze casos de raiva paralítica sugere que a desmielinização do nervo periférico é a primeira mudança observada nesses casos de raiva e que isso seria responsável pelo quadro de fraqueza muscular característico, o que não se observa na raiva furiosa (Chopra et al., 1980). A associação entre o aumento de células TCD8 e a paralisia foi descrita em modelo experimental por Galelli et al. (2000) e por Hooper (2005).

A raiva não clássica variavelmente manifesta-se sem características distintas, podendo assemelhar-se às manifestações vistas em pacientes com

enterovírus-71, encefalite Japonesa ou Nipah-vírus (Mahadevan et al., 2008).

Na fase neurológica final ocorrem paralisia da musculatura respiratória, coma e óbito (Brooks, et al., 2000).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês “World Health Organization”) recomenda que o tratamento pós-exposição seja instituído imediatamente sem aguardar os resultados de exame laboratorial dos espécimes obtidas do animal doente (WHO, 2004). A continuação ou não do tratamento irá depender da confirmação se o animal está mesmo raivoso.

3.6 Diagnóstico da infecção rábica

Para que seja efetuado o diagnóstico laboratorial comprobatório de raiva é necessário que exista uma suspeita da doença, incluindo história de exposição a um animal potencialmente rábico, principalmente em regiões endêmicas, associado a uma sintomatologia compatível.

O diagnóstico da infecção rábica pode ser efetuado *ante-mortem* ou *pós-mortem*. O diagnóstico *ante-mortem* é feito em material de impressão da córnea, da saliva, do fluído cerebrospinal, do soro, biópsia de pele, em especial da região do pescoço ou mesmo em biópsias do SNC (Blenden et al., 1983; Zaidman et al., 1998)

Para o diagnóstico *pós-mortem* deve ser usado material de impressão do SNC, particularmente do hipocampo, tronco cerebral e cerebelo ou

fragmentos teciduais dessas áreas, pois há maior probabilidade do encontro do antígeno viral (Jogai et al., 2000; Woldehiwet, 2005).

As metodologias padrões rotineiramente utilizadas são: a imunofluorescência direta (padrão ouro), o exame microscópico de tecido cerebral com identificação de inflamação e corpúsculos de Negri e o isolamento viral a partir de inoculação em camundongos (Woldehiwet, 2005).

Para identificação da variante antigênica é empregada a técnica de imunofluorescência indireta com utilização de um painel de anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína viral, produzido pelo “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), Atlanta, USA, que juntamente com o Centro Pan-Americano de Zoonoses (Cepanzo)/Opas, realizaram estudos com amostras virais isoladas nos diferentes países das Américas durante o período de 1987 a 1992. Com tais dados, os referidos órgãos selecionaram um painel reduzido, composto por oito anticorpos monoclonais, que permite detectar as cepas mais comuns de raiva na América Latina. Desta forma temos: a variante 1, referente a canina/capivara; variante 2 de cão; a variante 3 de *Desmodus rotundus*, que é um morcego hematófago; a variante 4 de *Tadarida brasiliensis*, que é um morcego insetívoro, mas também isolada de outras espécies não hematófagas; variante 5 isolada de morcegos da Venezuela; a variante 6 de *Lasiurus cinereus*, isolada de morcego insetívoro; a variante 7 de raposa do Arizona; a variante 8 de gambá dos Estados Unidos; variante 9 de *Tadarida brasiliensis* mexicana; variante 10 de gambá (Califórnia do Sul); variante 11 de morcegos do México (Diaz et al., 1994).

A reação de imuno-histoquímica empregando-se anticorpos monoclonais e policlonais anti-raiva é também utilizada para diagnóstico da raiva, principalmente quando temos amostras fixadas em formol, sendo essa técnica mais eficaz que o diagnóstico feito pela coloração de HE (Jogai et al., 2000; Jackson et al., 2001).

Outras metodologias empregadas são: a aglutinação por látex, o teste de Elisa, a hibridização “in situ” e a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) (Woldehiwet, 2005).

3.7 Alterações macroscópicas e histopatológicas da raiva no SNC

Macroscopicamente, as alterações encontradas na raiva são semelhantes às encefalites em geral. Há congestão das leptomeninges e do parênquima nervoso, que se mostra difusamente edemaciado, as alterações são simétricas, sem o desvio da linha média (Queiroz, 1999).

Microscopicamente, há presença de infiltrado linfomonocitário nas leptomeninges e em torno de vasos do tecido nervoso, caracterizando a perivascularite. Pode haver vasculite, com necrose e trombose de pequenos vasos. Neurônios podem mostrar inclusões virais, necrose e neuronofagia. Há ativação da microglia, com aparecimento de nódulos microgliais. A localização das lesões é difusa, com predomínio em certas regiões como hipocampo, tronco cerebral e cerebelo (Dupont e Earle, 1965; Assis e Rosemberg, 1984; Queiroz, 1999).

A alteração patognomônica da raiva é a presença do corpúsculo de Negri, uma inclusão viral citoplasmática encontrada em neurônios, principalmente do hipocampo (em células piramidais) e do cerebelo (em células de Purkinje) (Kristensson et al., 1996).

De acordo com Assis e Rosemberg (1984), nas regiões onde os corpúsculos de Negri são encontrados, as alterações inflamatórias são discretas ou ausentes, sendo importante que o exame histopatológico do cérebro inclua também fragmentos do tronco cerebral ou medula espinal, para pesquisa de infiltrado inflamatório. Entretanto, Jogai et al. (2000), demonstram uma correlação positiva entre inflamação e intensidade da imunopositividade para o antígeno viral.

Permanece a questão se existe no parênquima cerebral dicotomia entre a resposta inflamatória e a presença de inclusões virais em diferentes regiões do SNC.

3.8 Barreira hematoencefálica e privilégio imune do SNC

A barreira hematoencefálica (BBB, do inglês “blood-brain barrier”) é composta por uma rede extensa de células endoteliais, astrócitos e neurônios adjacentes que formam unidades neurovasculares funcionais, tendo um importante papel na manutenção de um microambiente precisamente regulado para que haja uma atividade neuronal segura, ou seja, livre de agentes e partículas indesejáveis (Kim et al., 2006).

As células endoteliais protegem o SNC de mudanças prejudiciais em nível vascular e ainda contribuem para a demanda nutricional do SNC. As junções entre as células endoteliais são extremamente estreitas, oclusivas e funcionam como um bloqueio físico para a entrada de íons, peptídeos e células imunes do sangue para o SNC (Huber et al., 2001). Embora a interação estreita dos componentes da BBB resulte de uma relação triangular entre células endoteliais, células da glia e neurônios, as células endoteliais são as mais proeminentes nessa função (Dermietzel e Krause, 1991).

Os astrócitos que também participam da BBB são considerados a “cola” do SNC, tendo papel fundamental na sustentação, no desenvolvimento e nas interações neuronais. Os astrócitos também têm sido descritos como importantes no controle do tônus vascular, na neurogênese e na sinaptogênese (Janzer e Raff, 1987).

Dessas interações triangulares resulta, em última análise, um mecanismo de proteção para os neurônios, permitindo assim que os mesmos possam exercer com regularidade suas funções vitais.

A quebra ou colapso da BBB está relacionado com doenças que incluem edema cerebral, isquemia, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, tumores e doenças infecciosas (Lee et al., 1999).

Para limitar o dano ao cérebro, esse órgão conta com um sistema imune relativamente privilegiado. A ligação entre a BBB e o privilégio imune do cérebro foi sugerida por Barker e Billingham (1977).

O SNC é organizado em diferentes compartimentos: o parênquima, os ventrículos contendo plexo coróide e fluído cerebrospinal e as meninges. Estudos experimentais referentes à resposta imune inata e adquirida demonstram que o privilégio imune do SNC é compartimentalizado, sendo o parênquima o responsável por esse privilégio imune, pois a reatividade imune de ventrículos incluindo o plexo coróide e das meninges é similar a da periferia (Andersson et al., 1992; Blond et al., 2002).

A aparente perda da comunicação entre o parênquima do SNC e o sistema imune periférico pode ser resultado do comportamento dos braços aferentes e eferentes da resposta imune. O braço aferente da resposta imune envolve apresentação de antígeno para células T “naive” através da migração de células dendríticas (DCs do inglês “dendritic cells”) que capturam os antígenos e os levam para órgãos linfóides (Galea et al., 2007). Estudo imuno-histoquímico falhou em demonstrar a presença de células com imunofenótipo de DCs no parênquima ou no espaço perivascular de cérebro não inflamado, embora elas estivessem presentes nas meninges e no plexo coróide (Matyszak e Perry, 1996).

O braço eferente da resposta imune para antígenos do SNC é também especializado para conferir um grau de privilégio imune. Deve-se ter em mente que este privilégio é mais relativo que absoluto. A entrada de monócitos, células B e células T dentro do SNC é altamente regulada. As células T específicas para o antígeno sofrem uma série de modificações antes de exercerem sua função efetora. O mais importante obstáculo é a apoptose. Todas as células do SNC expressam Fas ligante (FasL), o que

resulta em apoptose de células T positivas para Fas (Bechmann et al., 1999).

Caso as células T escapem da apoptose, elas dependem do reconhecimento dos antígenos em um contexto de complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês “major histocompatibility complex”), contudo a expressão constitutiva de MHC no SNC normal é mínima. No cérebro inflamado ocorre uma maior expressão de MHC, embora ela seja altamente regulada pelos neurônios (Perry, 1998).

As células T dentro do parênquima do SNC são reguladas por astrócitos, microglia e neurônios. Os astrócitos secretam fatores solúveis não identificados que inibem a proliferação de células T e a produção de citocinas, ou ainda podem induzir células T regulatórias (Meinl et al., 1994; Trajkovic et al., 2004).

O privilégio imune no SNC é indispensável para limitar o dano durante a inflamação em um órgão sensível, com pouca capacidade regenerativa. Contudo, é importante ressaltar que o privilégio imune tão discutido não é a ausência total de componentes imunológicos, mas sim a regulação elaborada deles (Galea et al., 2007).

3.9 Resposta do hospedeiro frente à infecção rábica

A resposta imune durante a infecção rábica é peculiar devido ao privilégio imune do SNC (Barker e Billingham, 1977). O imunoprivilégio está baseado principalmente na restrição da migração de células T e na perda de

células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês “antigen-presenting cells”). Aliado a perda da eficácia imune, as cepas patogênicas do vírus rábico favorecem um estado imunossupressor da resposta imune na periferia (baço). Como resultado, temos uma subversão global das defesas imunes do hospedeiro pelo vírus da raiva (Lafon et al., 2002).

Após o vírus rábico ultrapassar as junções estreitas entre as células endoteliais e passar pelo controle dos astrócitos, ele invade o SNC e se depara com os macrófagos residentes, denominados de microglia. A microglia apresenta várias funções no SNC, dentre elas, a de APCs, sendo mais eficiente nesse papel do que os astrócitos (Aloisi et al., 1998). Outra função importante da microglia é a produção de TNF- α e óxido nítrico (NO, do inglês “nitric oxide”), através da ativação da enzima sintase óxido nítrico induzível (iNOS, do inglês “inducible nitric oxide synthase”) na tentativa de combater a infecção (Roitt et al., 1998).

Além dos macrófagos, as células NK desempenham importante função na resposta imune inata, destruindo as células infectadas por vírus sem nenhuma sensibilização prévia aparente e sem o envolvimento do MHC. Essas células respondem rapidamente a entrada do vírus e montam uma resposta citolítica e proliferativa vários dias antes que a resposta T específica seja mobilizada (Panpanich et al., 1992). Estudos em raiva demonstram esse papel protetor das células NK (Panpanich et al., 1992; Meigd e Kaneno, 2000).

Marquette et al. (1996), demonstram em estudo experimental que após a injeção de CVS (cepa fixa do vírus rábico, do inglês “Challenge Virus

Standard”) em ratos houve progressão da infecção na medula e no cérebro, acompanhada da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e quimiocinas. A expressão dessas citocinas atraía os linfócitos através da BBB, contudo, foi observado que a doença se desenvolveu em ambos os animais, tanto os imunocompetentes quanto àqueles que haviam perdido as células T, indicando que as células T são ineficientes no controle da encefalite rábica aguda.

A ineficiência da migração de células T no controle da infecção rábica poderia indicar que as células T não são específicas para controlar o vírus da raiva ou que essas células poderiam ser anérgicas ou ainda serem destruídas por apoptose após sua entrada no SNC. A anergia das células T poderia estar relacionada com a pobre expressão do MHC na glia de animais infectados (Irwin et al., 1999).

Entretanto, Lafon (2005) descreve em modelo experimental que a proteção contra o vírus da raiva é conferida pelos linfócitos TCD4+, pois a encefalopatia fatal só ocorre após a depleção dessas células e não após depleção de linfócitos TCD8+.

Estudos na literatura demonstram que a resposta de células T está envolvida na paralisia local na infecção rábica, pois camundongos deficientes de células TCD8 não desenvolvem paralisia, mas desenvolvem encefalite letal (Galelli et al., 2000; Hooper et al., 2005).

Por outro lado, de acordo com Hemachudha et al. (1988), pacientes com imunidade de células T intacta, com altas concentrações de receptor de interleucina 2 (IL-2) e interleucina 6 (IL-6) no soro, morrem mais cedo e

apresentam raiva furiosa, enquanto que aqueles que perderam tais respostas sobreviveram por mais tempo e apresentaram raiva parálitica.

O TNF, outra citocina pró-inflamatória, é produzido predominantemente por macrófagos ativados e linfócitos T, contudo, nas doenças inflamatórias, outras células como mastócitos, neutrófilos, linfócitos B, células NK e células endoteliais também podem produzir essa citocina. Um dos papéis biológicos principais do TNF é agir na defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus e outros parasitas. Desta forma, fisiologicamente, o TNF é importante para a resposta normal à infecção, mas a produção inapropriada ou excessiva dessa citocina pode ser prejudicial (Bradley, 2008).

Na encefalite rábica a produção local de citocinas pode ativar o receptor p55 TNF- α , resultando no recrutamento de células T e B. Essa ação pode levar à promoção do reconhecimento imune contra o vírus da raiva em locais “imunes privilegiados” e provocar outra amplificação da cascata de citocinas, intensificando o padrão sintomático límbico. A demora na mortalidade foi observada em camundongos deficientes de receptor p55 TNF- α , que apresentam um aumento de IFN- γ e IL-10 e redução nas células inflamatórias no SNC. Portanto, a expressão de TNF- α seria deletéria para a sobrevivência do hospedeiro frente à infecção (Camelo et al., 2000).

Nuovo et al. (2005), demonstram em estudo imuno-histoquímico de SNC em material parafinado, que a encefalite rábica é uma infecção maciça de neurônios, com concomitante alta expressão de TNF- α e iNOS em células vizinhas não infectadas. Essa alta expressão de TNF- α e iNOS

poderia levar ao dano neuronal e prejuízo ao tecido de suporte dos mesmos. Outros estudos também relatam o papel prejudicial do iNOS na infecção rábica (Ubol et al., 2001; Shin et al., 2004).

A resposta imune, portanto, pode definir o curso e as manifestações clínicas da doença. Há, todavia, uma necessidade premente de melhor entendimento da imunopatogenia que se processa no homem e se os dados experimentais disponíveis são semelhantes àqueles que ocorrem na doença humana.

Na figura 5 a seguir podemos ver um esquema ilustrativo resumido dos dados descritos na literatura sobre a imunopatogenia experimental da raiva.

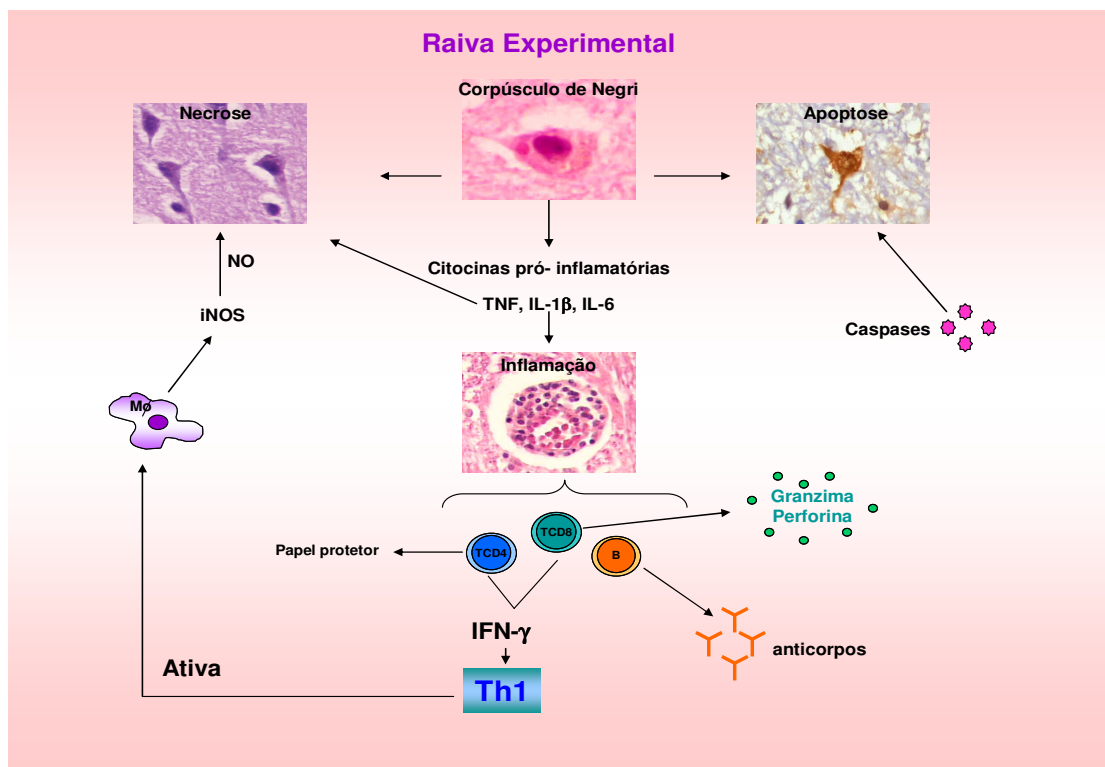


Figura 5. Esquema ilustrativo da imunopatogenia na raiva experimental

3.10 Papel da apoptose na infecção rábica

As viroses neurotrópicas podem causar morte quer seja por apoptose ou por necrose. A apoptose depende da síntese de macromoléculas e requer energia, enquanto que a necrose está associada com a perda de energia (Jackson, 2003).

A apoptose é caracterizada pela condensação nuclear e citoplasmática celular seguida pela fragmentação da cromatina nuclear e subsequente formação de fragmentos múltiplos de material nuclear condensado e citoplasma (Buja et al., 1993). Pode ser considerada como uma resposta celular inata para limitar a propagação viral, podendo ocorrer por uma reação intrínseca dentro de células infectadas ou por ação de células T, as quais induzem apoptose de células infectadas por vírus através da produção de citocinas, tais como TNF- α , liberação de perforina e granzima e por ativação do Fas em células alvo (Jackson e Rossiter, 1997; Galelli et al., 2000).

Estudos têm proposto que a apoptose é a principal causa de morte neuronal na infecção rábica, sendo causada devido à indução da resposta imune T - dependente e não devido ao efeito deletério direto do vírus (Jackson e Rossiter, 1997; Fu e Jackson, 2005; Ubol et al., 2005).

O vírus da raiva pode facilitar sua disseminação quer seja por desenvolvimento de estratégias anti-apoptóticas, quer seja por mecanismos de escape frente ao ataque de linfócitos T citotóxicos (CTL) e células

“Natural killer” (NK), causando apoptose dessas células imunes (Baloul e Lafon, 2003).

Outros trabalhos sugerem que a apoptose leva a despolimerização dos filamentos de actina, a qual na raiva pode impedir o transporte da proteína do nucleocapsídeo viral e a disseminação neuronal do vírus. O grau de apoptose está correlacionado com a quantidade de expressão da glicoproteína viral em neurônios infectados. Foi verificado que a baixa expressão da glicoproteína viral em células neuronais contribuiria para um menor grau de apoptose. Assim sendo, esta última representa um dos mais importantes mecanismos de defesa contra o vírus (Dietzschold et al., 2001; Yan et al., 2002; Warrell e Warrell, 2004).

Morimoto et al. (1999), observaram que cepas do vírus da raiva mais virulentas produzem menos apoptose em camundongos adultos que as cepas menos virulentas.

Deve-se ressaltar que Jackson et al. (2008), em estudo utilizando tecido cerebral parafinado de doze pacientes falecidos em decorrência da infecção rábica, não encontrou evidência morfológica de apoptose neuronal, concluindo que esta não tem papel patogênico importante na encefalite rábica humana.

O papel da apoptose na infecção rábica, os seus mecanismos determinantes, as células alvo que sofrem apoptose e as que contribuem de maneira decisiva para a patogênese da doença precisam ser melhor definidos e caracterizados.

3.11 Mecanismos de escape do vírus da raiva

O vírus da raiva, assim como outros vírus, apresenta mecanismos de escape do sistema imune, os quais garantem sua sobrevivência na célula hospedeira e assegura sua disseminação.

Durante a infecção viral, a destruição de células infectadas ocorre por apoptose, havendo assim a limitação da propagação viral. A apoptose pode ocorrer através de uma reação intrínseca dentro da célula infectada ou pela ação de células T citotóxicas, as quais induzem apoptose da célula infectada através da secreção de citocinas, tais como, TNF- α , liberação de perforinas e granzimas e ativação do mecanismo Fas/FasL. Em contraste, viroses podem facilitar sua disseminação através de mecanismos anti-apoptóticos ou por evasão do ataque de células T citotóxicas ou NK. As viroses inibem ativação de caspases, codificam análogos anti-apoptóticos da proteínas Bcl-2, inativam de p53 e usam mecanismos para prevenir apresentação através de MHC (Alcami e Koszinowski, 2000).

Estudos experimentais descritos na literatura detectaram um alto número de linfócitos T no local de inoculação do vírus rábico, bem como de macrófagos, sugerindo que essas células poderiam ser alvos do vírus rábico (Charlton e Casey, 1979; Thoulouze et al., 1997).

Baloul e Lafon (2003), sugerem que o vírus da raiva usa estratégias subversivas baseadas na preservação da rede neuronal e na destruição de células T que invadem o SNC em resposta a infecção. Além disso, o vírus

rábico secreta fatores neuroprotetores, como a IL-6, e desta forma, limita a inflamação do sistema nervoso infectado.

Outro mecanismo de escape do vírus rábico se deve a proteína P do seu genoma, que é considerada uma antagonista da produção de interferon (IFN). O IFN é uma citocina que primeiramente defende o hospedeiro contra infecções virais e a sua supressão leva a perda da resposta imune de perfil Th1 (Brzózka et al., 2005; Vidy et al., 2005).

3.12 Medidas de controle da raiva

O controle da raiva depende da prevenção da infecção de cães e gatos por meio de vacinação em áreas endêmicas e controle da movimentação dos mesmos.

Os programas de erradicação também necessitam da adoção de estratégias apropriadas para eliminação ou redução da infecção em reservatórios selvagens do vírus. Em muitas partes do mundo onde a principal fonte de infecção humana são os cães, a vacinação em massa e a redução dos números de cães abandonados permanecem como as mais efetivas medidas de controle. Na Europa, o controle da raiva tem por objetivo eliminar a infecção em raposas através de vacinação. Na América do Sul, a vacinação em massa do gado juntamente com medidas de redução do número de morcegos vampiros é freqüentemente necessária para a redução da raiva nesses animais (Woldehiwet, 2005).

Recente estudo na literatura descreve a vacinação oral de morcegos vampiros (*Desmodus rotundus*) na tentativa de prevenção da raiva transmitida por esses animais (Almeida et al., 2008).

São tantas as dúvidas ainda e os mistérios que envolvem o vírus da raiva que Rupprecht et al. (2002), comentam que: “Alguém que seriamente trabalha no campo da raiva sente-se fascinado pela sua complexidade e frustrado pelos seus mistérios”.

MÉTODOS

4- MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Casos de infecção rábica

Realizou-se estudo retrospectivo em amostras parafinizadas de SNC provenientes de necropsias de oito casos de raiva humana, cedidos pelo Serviço de Patologia do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará (PA). Esses casos foram decorrentes de um surto de raiva humana provocada por mordida de morcego vampiro, ocorrido nos municípios de Portel, Vizeu e Augusto Corrêa, Estado do Pará, nos anos de 2004 e 2005 (Tabela 1).

Os pacientes apresentavam como sintomas: febre persistente, cefaléia, constipação intestinal, retenção urinária, hemorragia digestiva alta, vômitos após ingestão de água/alimentos, parestesia ascendente de membros inferiores, paralisia de membros inferiores, desorientação, irritabilidade, hidrofobia, aerofobia, dispnéia, insuficiência respiratória.

Todos os pacientes receberam medicação (dipirona, plasil, ranitidina, dolantina, nubain, diazepam, ringer lactato, buscopan, profenid, hidrocortisona, prometazina) para tratar os sintomas. Cerca de 75% desses pacientes receberam também vacina e soro anti-rábico pós-exposição.

Tabela 1 - Raiva: dados gerais dos pacientes

Registro	Sexo	Idade	Local da mordida	Data da mordida	Tempo de Doença	Município
N320/04	M	29 anos	ignorado	2 meses antes dos sintomas	11 dias	Portel
N321/04	M	41 anos	Hálux E**	4 meses antes dos sintomas	14 dias	Portel
N322/04	M	11 anos	Hálux E	2 meses antes dos sintomas	19 dias	Portel
N323/04	F	25 anos	Hálux E	1 mês antes dos sintomas	10 dias	Portel
N331/04	M	58 anos	Hálux D*	1 ano antes dos sintomas	13 dias	Vizeu
N355/05	M	16 anos	MMII***	1 mês antes dos sintomas	10 dias	Augusto Corrêa
N360/05	M	25 anos	Hálux D	2 meses antes dos sintomas	9 dias	Augusto Corrêa
N361/05	F	51 anos	Pé	1 mês antes dos sintomas	8 dias	Augusto Corrêa

*Hálux D: hálux direito; **Hálux E: hálux esquerdo

***MMII: membros inferiores

4.1.2 Casos-controle

O grupo controle foi composto por amostras parafinizadas de SNC de oito necropsias obtidas de pacientes do Serviço de Verificação de Óbito da Capital (SVOC), São Paulo - SP, que faleceram por problemas diversos, os quais não comprometeram o SNC. Foram selecionados casos de necropsias com idade aproximada aquela do grupo infectado. Os critérios para exclusão desse grupo foram: presença de alguma infecção no sistema nervoso,

doença auto-imune, doença demencial, uso de quimioterápicos ou radiação (Tabela 2).

Tabela 2 - Grupo controle: dados gerais dos pacientes

Registro	Sexo	Idade	Data do óbito	Causa/morte
HC07/276	F	41 anos	05/05/07	Insuficiência respiratória
HC07/315	F	48 anos	21/05/07	Diabetes Mellitus
HC07/369	F	53 anos	19/06/07	Insuficiência respiratória
SVOC08/3376	M	31 anos	14/04/08	Infarto agudo do miocárdio
SVOC08/3474	M	39 anos	17/04/08	DPOC*
SVOC08/3660	M	42 anos	22/04/08	Infarto agudo do miocárdio
SVOC08/3884	M	45 anos	28/04/08	Pneumonia lobar bilateral
SVOC08/3891	F	26 anos	29/04/08	Aterosclerose complicada

* DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

4.2 Confirmação diagnóstica para infecção rábica e processamento do material

Após a realização de necropsia, fragmentos do SNC foram retirados e enviados para confirmação diagnóstica da infecção rábica por técnica de imunofluorescência direta e prova biológica em camundongos, realizadas no Instituto Evandro Chagas, Belém - PA. O surto de raiva ocorrido no Pará foi também bem caracterizado molecularmente em material de SNC a fresco pelo grupo do Dr. Pedro Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas, Pará, Brasil (da Rosa et al., 2006), no qual foi detectado a variante 3 (*Desmodus rotundus*), esclarecendo que os casos humanos haviam sido causados pela mordida de morcegos vampiros.

Os fragmentos restantes foram imediatamente fixados por imersão em formalina a 10% tamponada e submetidos à inclusão em parafina. Foram representados diversos fragmentos do SNC, dos quais elegemos para esse estudo fragmentos do córtex frontal, córtex parietal, hipocampo e/ou região para-hipocampal, núcleos da base, cerebelo e bulbo. Os blocos de parafina dessas regiões foram então seccionados em cortes de quatro μm e posteriormente foi realizada a coloração histológica de Hematoxilina-eosina (HE). Para o grupo controle foram selecionadas as mesmas áreas pesquisadas no SNC de pacientes com infecção rábica.

4.3 Avaliação histopatológica pela coloração de HE

A avaliação histopatológica dos casos de raiva foi realizada através de análise semiquantitativa das secções coradas pela HE, seguindo os critérios descritos por Assis e Rosemberg (1984), mencionados na tabela 3 a seguir:

Tabela 3 - Raiva: avaliação histopatológica semiquantitativa da coloração de HE

Graus	Variáveis histológicas
0	Ausência de alterações histopatológicas.
1	Raros vasos (2-3) com perivasculite discreta*; ausência ou mínima reação microglial difusa.
2	Raros vasos (2-3) com perivasculite discreta ou densa**; discreta reação microglial difusa ou nodular e raras figuras de neuronofagia.
3	Vários vasos (mais de três) com perivasculite discreta ou densa; evidente reação microglial com pequenos nódulos e várias figuras de neuronofagia.
4	Vários vasos (mais de três) com perivasculite densa; intensa reação microglial difusa e nodular, necrose focal do parênquima com infiltrado inflamatório e numerosas figuras de neuronofagia.

* Perivasculite discreta: somente uma camada de células inflamatórias em torno do vaso.

** Perivasculite densa: duas ou mais camadas de células inflamatórias circundando o vaso.

4.4 Método imuno-histoquímico

Para a imuno-marcação do vírus da raiva, dos fenótipos específicos das células envolvidas na resposta inflamatória e da expressão de citocinas, foi empregado o método imuno-histoquímico de Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC) (Hsu et al., 1981), com metodologia parcialmente modificada e padronizada pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para tanto, as etapas que compõem o método são descritas a seguir:

1- Os cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente silanizadas com solução de “3-aminopropyltiethoxy-silane” (Sigma, código A-3648).

2- Os cortes foram submetidos à desparafinização em banho de xilol por 30 minutos em estufa a 56°C e em um segundo banho de xilol por 10 minutos a temperatura ambiente.

3- Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%,70%) por cinco minutos cada.

4- Lavados em água corrente, água destilada e em tampão “phosphate buffer saline” (PBS) pH 7, 4 por cinco minutos cada.

5- Foi realizado o bloqueio de pigmentos de formol, submetendo-se os cortes à imersão em solução de hidróxido de amônio 25% diluído em álcool 95% por 30 minutos a temperatura ambiente.

6- Em seguida, os cortes foram lavados novamente em água corrente, água destilada e PBS por cinco minutos cada.

7- Foi realizado o bloqueio de peroxidase endógena, colocando-se os cortes em água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes a 3%, em três incubações de 15 minutos cada em câmara escura.

8- Os cortes foram então lavados em água corrente, água destilada e PBS por cinco minutos cada.

9- A recuperação antigênica foi realizada através de calor úmido, colocando-se os cortes imersos em tampão ácido acético diaminotetraetilo (Tris/EDTA) pH 9,0, já aquecido a temperatura de 95°C em banho-maria por 25 minutos.

10- Os cortes esfriaram por 20 minutos e posteriormente foram lavados em água corrente, água destilada e “phosphate buffered saline” (PBS) por cinco minutos cada.

11- Para o bloqueio das proteínas inespecíficas, os cortes foram incubados em solução de leite desnatado (Molico - Nestlé) 10% por 30 minutos a temperatura ambiente.

12- Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário específico ao antígeno pesquisado, diluído em solução de soro-albumina-bovina (BSA) a 1% por 12 horas a 4°C.

13- Os cortes foram lavados em PBS por duas vezes de 5 minutos cada.

14- Incubados com anticorpo secundário universal biotilado (anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra) do “Kit” LSAB peroxidase

(LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) por 30 minutos a 37°C.

15- Os cortes foram novamente lavados em PBS por duas vezes de cinco minutos cada.

16- Incubados com o reagente Estreptavidina peroxidase do “Kit” LSAB peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) por 30 minutos a 37°C.

17- Os cortes foram então lavados em PBS por duas vezes de cinco minutos cada.

18- A revelação da reação imuno-histoquímica foi realizada com o emprego de 45 µg do cromógeno 3’3 Diamino-benzidina (DAB) (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA, código D-5637), diluído em 100 ml de PBS, filtrado e acrescido 1200 µl de H₂O₂ 10 volumes a 3%.

19- Os cortes foram colocados na solução cromógena (DAB) por dois ou três minutos e posteriormente foram lavados em água corrente por cinco minutos.

20- Em seguida, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer’s (Dako North America, Carpinteria, CA, USA, código S3309) por cerca de um minuto.

21- Novamente lavados em água corrente por cinco minutos e desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%,95%,100%).

22- Finalmente, os cortes foram diafinizados em xilol e montados em resina “permount” (Fisher Scientific, código SP-15-100).

Alguns anticorpos (Tabela 4) necessitaram do emprego de um sistema de amplificação de sinal denominado CSA II (“Biotin-free Tyramide Signal Amplification System”, Dako North America, Carpinteria, CA, USA, código K 1497), que consiste na deposição de um componente fenólico ligado a fluoresceína, seguido por uma reação secundária com um anticorpo anti-fluoresceína conjugado com peroxidase. A revelação da positividade da reação ocorreu também com o emprego do cromógeno DAB.

4.4.1 Método imuno-histoquímico para citocinas

O método imuno-histoquímico para visualização das células expressando citocinas apresentou alguns diferenciais, como a incubação dos cortes em solução de PBS-saponina (tampão PSB pH 7,4 contendo saponina 0,1% - Sigma Chemical Co. St. Louis, MO/USA, código S 7900) por 10 minutos a temperatura ambiente antes do bloqueio de proteínas inespecíficas com leite Mólico. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários específicos para cada citocina, por 12 horas a 4°C, seguindo o protocolo já descrito anteriormente, contudo, antes e após a incubação com o anticorpo secundário, os cortes foram novamente colocados em tampão PBS-saponina por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida colocados em tampão PBS pH 7,4. Os procedimentos foram efetuados com metodologia parcialmente modificada e padronizada pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Tabela 4 - Relação de anticorpos primários empregados em imuno-histoquímica

Anticorpo	Marca/código	Exposição Antigênica	Diluição	Kit utilizado
Ig de camundongo anti-raiva	Instituto Evandro Chagas	Calor úmido	1:150	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-CD4 humano	Dako/M834	Calor úmido	1:1000	CSA II***
Ig de camundongo anti-CD8 humano	Dako/M7103	Calor úmido	1:30	CSA II***
Ig de camundongo anti-CD20 humano	Dako/M0755	Calor úmido	1:40	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-CD34 humano	Novocastra/NCL-END	Calor úmido	1:50	LSAB-AP**
Ig de camundongo anti-CD57 humano	Immunotech/1166	Calor úmido	1:100	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-CD68 humano	Dako/M0876	Calor úmido	1:30	LSAB-HRP*
Ig de cabra anti-IL1- β humana	R&D Systems/AF201-NA	Calor úmido	1:30	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-IL2r humana	Dako/V1614	Calor úmido	1:20	LSAB-HRP*
Ig de cabra anti-IL4 humana	R&D Systems/AF204-NA	Calor úmido	1:40	LSAB-HRP*
Ig de cabra anti-IL6 humana	R&D Systems/AF206-NA	Calor úmido	1:20	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-IL-10 humana	R&D Systems/MAB217	Calor úmido	1:10	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-IL-12 humana	R&D Systems/MAB219	Calor úmido	1:10	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-IFN- γ humano	R&D Systems/MAB285	Calor úmido	1:100	LSAB-HRP*
Ig de cabra anti-TNF- α humano	Genzyme/IP-300	Calor úmido	1:200	LSAB-HRP*
Ig de coelho anti-TGF- β humano	Santa Cruz/SC-82	Calor úmido	1:30	LSAB-HRP*
Ig de coelho anti-iNOS humana	Calbiochem/482728	Calor úmido	1:500	LSAB-HRP*
Ig de coelho anti-caspase-3	Cell Signaling/9661 S	Calor úmido	1:100	LSAB-HRP* LSAB-AP**
Ig de camundongo anti-GFAP	Dako/M0761	Calor úmido	1:200	LSAB-HRP* LSAB-AP**

*LASB-HRP: Kit imuno-histoquímico para peroxidase

**LSAB-AP: Kit imuno-histoquímico para fosfatase

*** CSA II: Kit imuno-histoquímico de amplificação de sinal para peroxidase

4.4.2 Reação imuno-histoquímica de dupla marcação

Para pesquisarmos a presença de vírus da raiva em astrócitos e em células endoteliais, além de verificarmos quais células (linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+, células NK, macrófagos e astrócitos) estariam sofrendo apoptose, realizamos reação imuno-histoquímica de dupla marcação. Essa reação baseia-se nos meus passos de uma reação imuno-histoquímica convencional, já descrita anteriormente, apresentando apenas alguns diferenciais.

Inicialmente, realizamos as etapas da reação imuno-histoquímica pesquisando-se o antígeno da raiva através da incubação dos cortes com anticorpo policlonal anti-raiva, seguindo as etapas do protocolo de reação até a revelação com o DAB. Para uma melhor visualização da reação de dupla marcação, foram acrescentados à solução de DAB, 45 µg de níquel tetracarbonilo ($\text{Ni}(\text{CO})_4$), para que esse cromógeno apresentasse a coloração negra ao invés da acastanhada, que poderia ser confundida com o vermelho do cromógeno empregado na reação seguinte.

Após revelação com DAB/ $\text{Ni}(\text{CO})_4$, os cortes foram lavados em água corrente, água destilada e PBS, por cinco minutos cada, incubados com o anticorpo “anti-glial fibrillary acid protein” (GFAP), utilizado para marcação de astrócitos, ou ainda com o anticorpo anti-CD34, para marcação de células endoteliais, por 12 horas a 4°C. A etapa seguinte foi a aplicação nos cortes do reagente “Envision alkaline phosphatase” (AP) (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K-4018), por 30 minutos a 37°C. A reação de

fosfatase alcalina foi então revelada com o cromógeno “Liquid Permanent Red” (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K-0640).

Em seguida, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer’s (Dako North America, Carpinteria, CA, USA, código S3309) por cerca de um minuto, lavados em água corrente por cinco minutos e colocados para secar a temperatura ambiente. Os cortes foram montados em resina “permount” (Fisher Scientific, código SP-15-100).

O resultado obtido foi astrócitos e células endoteliais corados em vermelho e o vírus da raiva em negro.

Para pesquisa de células apoptóticas realizamos reação imuno-histoquímica convencional para linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+, células NK CD57+, macrófagos CD68+ e astrócitos GFAP+. A revelação dessas células foi efetuada com aplicação do cromógeno DAB sem o acréscimo de níquel. Posteriormente, os cortes foram lavados em água corrente, água destilada e PBS, por cinco minutos cada, incubados com o anticorpo anti-caspase 3 por 12 horas a 4°C. Em seguida, após lavagens em PBS, o reagente “Envision alkaline phosphatase” (AP) (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K-4018) foi aplicado aos cortes por 30 minutos a 37°C. A reação de fosfatase alcalina foi então revelada com o cromógeno “Liquid Permanent Red” (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K-0640).

Desta forma, os resultados que obtivemos foram células coradas em marrom em concomitância com o vermelho, indicando que as mesmas estariam em processo de apoptose.

4.5 Características do anticorpo anti-raiva

O anticorpo policlonal camundongo anti-raiva utilizado nesse trabalho foi gentilmente cedido pelo Dr. Pedro Fernando Vasconcelos, pesquisador do Instituto Evandro Chagas, Belém - PA.

Esse anticorpo foi produzido a partir do soro de um paciente rábico da década de 60 e inoculado intraperitonealmente em camundongos adultos de quatro a cinco semanas. O esquema de inoculação foi composto de quatro injeções com intervalos semanais. Uma semana após a quarta injeção, o sangue dos camundongos foi colhido por via intracardíaca e o soro hiperimune foi obtido por centrifugação, sendo posteriormente congelado a -20°C até o seu uso.

4.6 Quantificação dos eventos

A quantificação das células infectadas pelo vírus da raiva, assim como das células inflamatórias imunomarcadas e de células expressando citocinas foi realizada por dois observadores independentes, com o auxílio de um graticulo de 1cm^2 acoplado a ocular para orientação e definição do tamanho da área. Esse graticulo define uma área de $0,0625\text{mm}^2$, utilizando-se ocular de 10x e objetiva de 40x. Foram contados 10 campos seqüenciais na meninge e 30 campos incluindo o ambiente perivascular e intraparenquimatoso, sendo a contagem realizada alternando-se o mesmo

número áreas de substância branca e de substância cinzenta, quando pertinente.

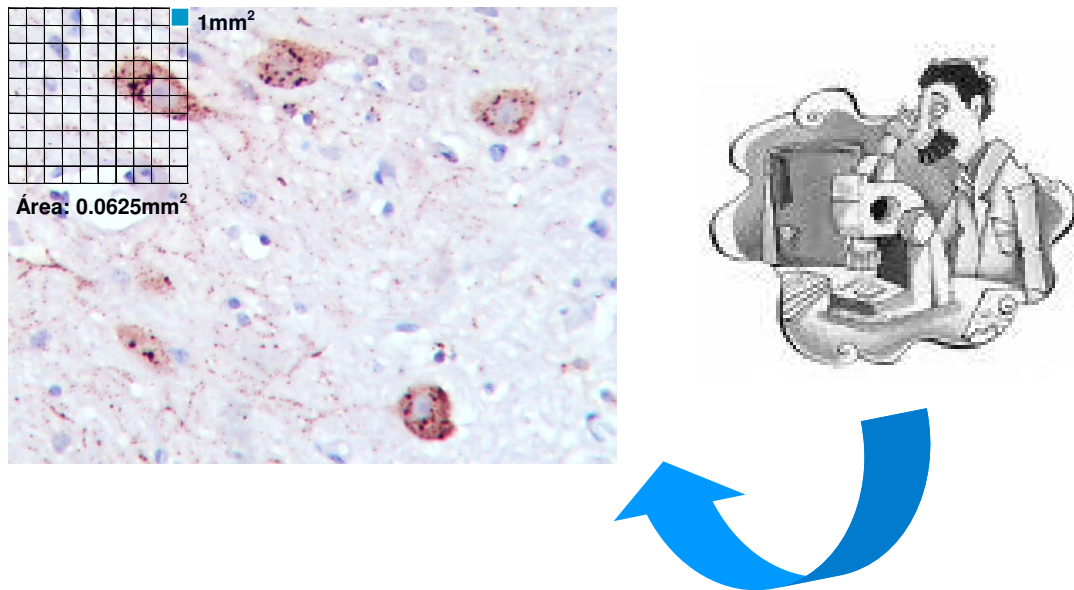


Figura 6. Demonstração do método quantitativo utilizando-se o graticulo para contagem das células imuno-marcadas, com ocular de 10x e objetiva de 40x. Área do graticulo de 0.0625 mm²

4.7 Western-blot e especificidade do anticorpo anti-raiva

Para comprovação da eficiência e da especificidade do anticorpo anti-raiva foi realizado o método molecular de Western-blot contra o vírus da raiva e contra células RAW de camundongos (controle negativo).

Os vírus rábicos empregados na reação de Western-blot foram extraídos a partir da vacina humana produzida em células Vero contra raiva, cedida pelo Instituto Pasteur de São Paulo. Essa vacina foi

produzida pela Aventis Pasteur AS, Lyon, França, contendo vírus rábico inativado cepa WISTAR PM/WI 38-1503-3M, sendo embalada e distribuída pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

As células RAW de camundongos contidas em frascos plásticos de 75cm² foram fragmentadas e recuperadas por centrifugação. As vacinas anti-raiva liofilizadas foram reconstituídas com solução de cloreto de sódio a 0,4% e posteriormente, aplicadas em colunas “Cibacron Blue-G” (BioRad) para remoção de albumina. Os vírus foram recuperados da suspensão através de precipitação por ácido tricloroacético (TCA) 5% em banho gelado a 4°C e centrifugação a 12.400 rpm por cinco minutos. Os sedimentos foram neutralizados e suspensos em tampão de amostra SDS-PAGE (do inglês “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”) com uréia 4M, com desnaturação por incubação a 75°C por 15 minutos. A suspensão foi clareada a 12.400 rpm por um minuto e aplicado em SDS-PAGE de 5-20%.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por transferência eletroforética semi-seca. As proteínas foram contrastadas com “Ponceu S” e posteriormente a membrana foi lavada em água “miliQ” e bloqueada com albumina bovina a 5% por 12 horas. Após duas lavagens de 10 minutos com PBS, a membrana foi incubada por 12 horas com o anticorpo policlonal camundongo anti-raiva na diluição de 1:500, em albumina bovina a 1%. Após a incubação com o anticorpo específico, a membrana de nitrocelulose foi lavada em PBS por duas vezes de 10 minutos e incubada com o “Kit” LSAB peroxidase

(LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) por 30 minutos com cada reagente do “kit”. A reação foi revelada com o emprego de DAB (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA, código D-5637). As faixas marcadas do vírus rábico e das células RAW de camundongos foram comparadas por marcadores de peso molecular.

4.8 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A metodologia para RT-PCR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur de São Paulo, havendo colaboração dos Laboratórios de Patologia Molecular e Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para realização da extração de RNA viral.

4.8.1 Desparafinização dos cortes com xilol

Foram colocados em tubos de 2 mL, 20 cortes com 5 µm de espessura de material parafinado de diferentes regiões do SNC (córtex frontal e parietal, hipocampo e região para-hipocampal, núcleos da base, cerebelo e bulbo). Esses cortes foram então desparafinizados adicionando-se a cada tubo 1 mL de xilol puro, aquecendo-os a 56°C por 10 minutos e em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000 rotações por minuto (rpm) a temperatura ambiente. O xilol foi desprezado e foram adicionados

aos tubos novamente 1 mL de xilol puro a temperatura ambiente por mais 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram novamente centrifugados a 14000 rpm por cinco minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi então desprezado.

A seguir, foi adicionado aos tubos 1 mL de etanol 100%, agitando-se por dez segundos. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por cinco minutos a temperatura ambiente. Essa etapa foi novamente repetida por mais duas vezes. Após a remoção e desprezo do sobrenadante, os tubos foram colocados invertidos para evaporação total do etanol remanescente.

4.8.2 Desparafinização dos cortes com Tween 20

Foram colocados em tubos de 2 mL, 20 cortes com 5 µm de espessura de material parafinado de diferentes regiões do SNC. A cada tubo foram adicionados 100 µL de solução Tween 20 a 0,5% e após homogeneização, os tubos foram aquecidos a 90°C por 10 minutos e resfriados para 55°C utilizando-se termociclador.

4.8.3 Métodos de extração de RNA viral

Para a extração de RNA viral tecidual utilizado na RT-PCR, foram realizados três protocolos diferentes, na tentativa de padronizar o melhor protocolo para a preservação do RNA.

A - Extração de RNA viral com “Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction” (Trizol)

Após a etapa de desparafinização com xilol descrita anteriormente, foram adicionados aos tubos 1 mL de Trizol (Invitrogen™), homogeneizando-os por cerca de 20 segundos, deixando-os em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio a cada tubo, homogeneizando-se por cerca de 20 segundos e deixando-se em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa obtida nesse processo foi então transferida para outro tubo limpo.

Nos tubos contendo a fase aquosa, foram adicionados os mesmo volumes de isopropanol, homogeneizando-se e incubando-se os tubos a temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação houve a remoção do e desprezo do sobrenadante.

A seguir, foram adicionados aos tubos 1 mL de etanol a 75%, homogeneizando-se por cerca de 20 segundos e centrifugando-se a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O etanol foi desprezado e os tubos foram secos a temperatura ambiente.

Para a resuspensão do RNA viral foi utilizado 25 µL de água livre de RNase, deixando-se os tubos em banho-maria a 56°C por 10 minutos. O

RNA extraído foi mantido em freezer - 20°C até o momento de uso (Witchell et al., 2008).

B - Extração de RNA viral com Chelex 100 (BioRad)

O protocolo para extração de RNA com Chelex 100 foi baseado no método descrito por Coombs et al. (1999) e reproduzido por Simonato et al. (2007) utilizado para extração de DNA em material parafinado.

Após a desparafinização dos cortes com Tween 20, foi adicionado a cada tubo 20 µL de proteinase K (20mg/mL) e os tubos foram incubados em banho-maria a 55°C, durante três horas, agitando-se gentilmente os tubos a cada uma hora.

Em seguida, foi adicionado a cada tubo 400 µl de Chelex 100 a 5% (diluído em solução de Tris 10mM e EDTA 1mM), aquecendo-se a 99°C durante 10 minutos e agitando-se após o término do aquecimento.

Os tubos foram então agitados a 13200 rpm durante 15 minutos, aquecidos novamente a 45°C por cinco minutos e posteriormente adicionado 400 µl de clorofórmio a cada tubo.

Houve uma nova centrifugação dos tubos a 13200 rpm por 15 minutos e o sobrenadante contendo RNA viral foi transferido para outro tubo limpo e armazenados em freezer - 20°C até o momento de uso.

C - Extração de RNA viral com “kit Recover ALL™ Total Nucleic Acid Isolation”

A extração de RNA viral com o “kit Recover ALL™ Total Nucleic Acid Isolation” (Ambion, código AM1975), seguiu-se de acordo com as instruções do fabricante.

Após a etapa de desparafinização, os cortes sofreram uma etapa de digestão pela protease, seguida do isolamento do RNA, posterior digestão com nuclease e uma etapa de purificação final.

4.8.4 Transcrição reversa (RT)

Para realização da RT foi preparado para cada amostra um solução (MIX) contendo 12 μL de água ultrapura, 8 μL de tampão (5x First-Strand Buffer, Invitrogen™); 250mM de Tris-HCL, pH 8,3; 375mM de KCL; 15mM de MgCl_2 , 6 μL de dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfato – dATP, dTTP, dCTP e dGTP – 10mM), 4 μL de DTT (Dithiothreitol 0,1M, Invitrogen™), 5 μL do “primer” senso (504) a 10mM e 5 μL do “primer” anti-senso (304) a 10mM. Após a adição desses componentes, homogeneizaram-se rapidamente os microtubos e submeteu-se a uma rápida centrifugação (“spin”). Em seguida, adicionou-se 1 μL (40 unidades/ μL) de RNaseOUT™ (Invitrogen™) e 1 μL (200 unidades/ μL) de SuperScript™ II RT (Invitrogen™). Homogeneizava-se levemente, submetia-se novamente a uma centrifugação rápida e então se colocava 42 μL do MIX para cada microtubo. A esses microtubos foram

adicionados 5 μ L de RNA total obtido na etapa de extração. Para evitar contaminação, o MIX foi preparado em fluxo destinado apenas ao trabalho com material não contaminado. Depois de preparado, o material foi levado à outro fluxo para a adição de 5 μ l RNA total. Todas as etapas de preparação do MIX e adição do RNA foram feitas com tubos mantidos em gelo. Os tubos foram levados ao termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) a temperatura de 42°C por 1 hora.

Em cada reação uma amostra de referência (“Challenge Virus Standard” - CVS) foi utilizada como controle positivo e a água ultrapura como controle negativo.

4.8.5 Amplificação do cDNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a PCR, foi preparado outro MIX. Para cada amostra foram utilizados 50,5 μ L de água ultrapura, 10 μ L de tampão (10x PCR buffer - Invitrogen™; 200mM de Tris-HCL, pH 8,4; 500mM KCl), 16 μ L de dNTPs (1,25mM), 5 μ L de “primer” senso (504) a 10mM, 5 μ L de “primer” anti-senso (304) a 10mM e 5 μ L de MgCl₂ (50mM).

Os reagentes foram homogeneizados e centrifugados rapidamente. Em seguida, foram adicionados 0,5 μ L (5 unidades/ μ L) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™) e homogeneizava-se levemente. Dessa solução, resultavam 92 μ L de MIX para cada amostra, adicionando-se 10 μ L do c-DNA obtidos na reação de RT.

O mesmo cuidado foi observado em relação à contaminação das amostras e quanto ao resfriamento do MIX em gelo.

Os tubos foram então levados ao termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf). A amplificação do DNA foi realizada com os seguintes ciclos: 1º ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 2º ciclo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, 3º ciclo de anelamento a 55°C por 45 segundos, 4º ciclo de extensão a 72°C por 2 minutos. Repetia-se do 2º ciclo ao 4º ciclo 35 vezes e em seguida, terminava-se com o ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Ao final dos ciclos, as amostras estavam prontas para serem visualizadas em gel ou armazenadas a - 20°C até o momento do uso.

4.8.6 Avaliação do resultado da amplificação

Os produtos das amostras submetidas à RT-PCR foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos à eletroforese. O gel de agarose a 1% foi preparado com 50 mL de água ultrapura e 0,5g de agarose, fundida, aquecendo-se por dois minutos em microondas. A agarose líquida foi colocada em uma cuba com pente. Após a solidificação, o gel foi colocado dentro de uma cuba com tampão de corrida Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x (Invitrogen™), o pente retirado e as amostras aplicadas nos poços formados.

Adicionou-se 1 µL de corante (10x BlueJuice - Invitrogen™) a 10 µl da amostra que depois de homogeneizada, foi aplicada no gel de agarose. O

DNA presente nas amostras foi intercalado com brometo de etídeo adicionado ao tampão de corrida na concentração de 1µg/mL. No primeiro e no último poço, aplicavam-se 5 µL do marcador de peso molecular (100 bp DNA *Ladder* - Invitrogen™). As amostras foram então visualizadas em transluminador de luz ultravioleta (UV).

Tabela 5 - Raiva: oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizados nas reações de transcrição reversa (RT) e reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Primer	Polaridade	Região viral	Seqüência	Tamanho do fragmento
504	senso	N	TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCTGACT	249pb
304	anti-senso	N	TTGACGAAGATCTTGCTCAT	

4.9 Análise estatística

Na ausência de homogeneidade de variâncias, a comparação entre grupos foi feita pelo teste não paramétrico de “Mann-Whitney” para duas variáveis ou pelo teste não-paramétrico de “Kruskal-Wallis” para três ou mais variáveis. Quando foi empregado o teste de “Kruskal-Wallis”, a comparação dos grupos dois a dois foi feita pelo pós-teste de comparação múltipla de “Dunn”. Sempre foi avaliada a probabilidade de igualdade entre grupos, sendo considerada significativa quando esta era menor que 5% ($p \leq 0.05$). A avaliação de eventuais correlações entre valores foi feita pelo teste de correlação de postos de “Spearman”, sendo a correlação expressa em r quando significativa.

Toda análise estatística foi realizada através do pacote estatístico “Graph Pad Prism 4.0” para “Windows” (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

5.1 Dados gerais dos pacientes

A idade dos pacientes com infecção rábica variou de 11 anos a 58 anos, com média de idade de 45,3 anos. No grupo controle a idade variou de 26 anos a 53 anos, com média de idade de 40,6 anos.

Em relação ao sexo dos pacientes, naqueles que apresentaram infecção rábica houve um predomínio do sexo masculino, com 75% dos casos contra 25% dos casos femininos. Nos pacientes do grupo controle observamos uma distribuição homogênea entre os sexos, com representação de 50% de cada.

5.2 Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica dos casos de raiva humana foi realizada pela análise semiquantitativa da coloração de HE, de acordo com critérios já estabelecidos por Assis e Rosemberg (1984), descritos previamente nos métodos. Os resultados dessa avaliação podem ser visualizados na tabela 6.

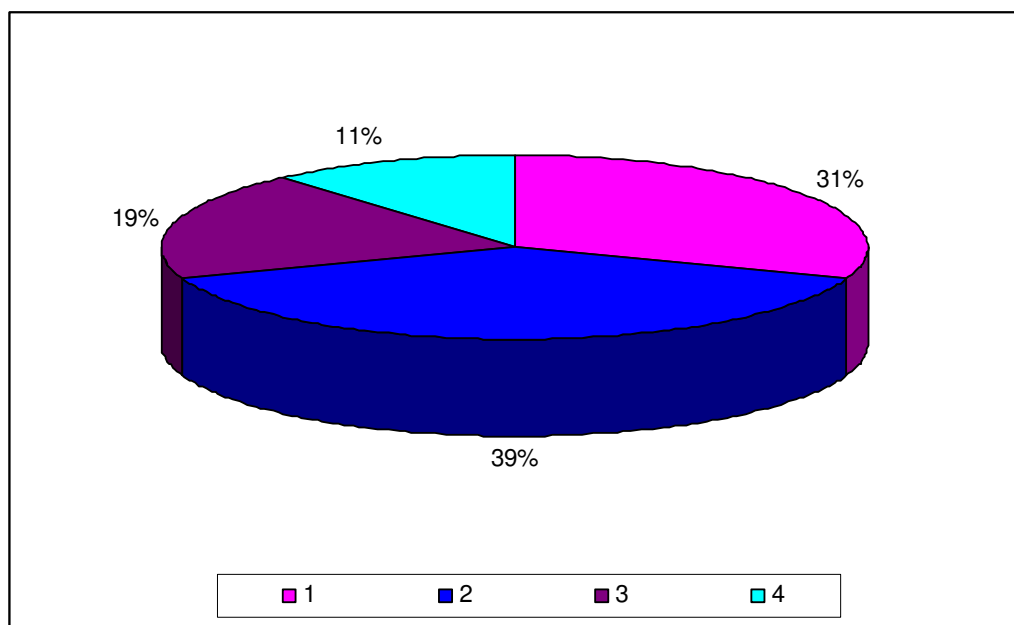
Tabela 6 - Raiva: avaliação histopatológica pela coloração de HE

Casos	Classificação histopatológica
N320/04A	1
N320/04B	NHB
N320/04E	2
N320/04F	3
N320/04J	1
N320/04L	4
N321/04A	2
N321/04B	2
N321/04E	3
N321/04F	2
N321/04J	1
N321/04L	1
N322/04A	2
N322/04B	1
N322/04E	2
N322/04F	3
N322/04J	NHB
N322/04L	3
N323/04A	0
N323/04B	0
N323/04E	NHB
N323/04F	1
N323/04J	0
N323/04L	4
N331/04A	0
N331/04B	0
N331/04E	NHB
N331/04F	1
N331/04J	0
N331/04L	NHB
N355/05A	0
N355/05B	0
N355/05E	NHB
N355/05F	2
N355/05J	1
N355/05L	2
N360/05A	0
N360/05B	0
N360/05E	0
N360/05F	2
N360/05J	0
N360/05L	4
N361/05A	0
N361/05B	0
N361/05E	0
N361/05F	2
N361/05J	0
N361/05L	3

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo
NHB: não havia bloco

Nós observamos que em 100% dos casos de raiva havia alguma alteração histológica em uma ou mais regiões do SNC, sendo que em 39% dos casos houve o predomínio do grau histológico 2 (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Raiva: graus de alterações histopatológicas. **1** - alteração discreta. **2** - alteração discreta para moderada. **3** - alteração moderada para intensa. **4** - alterações intensas



A avaliação do microambiente meningeal pode ser visto na tabela 7. Notamos congestão vascular e infiltrado inflamatório mononuclear em 87,5% das amostras, caracterizando quadro de meningite (Figura 7 A).

Tabela 7 - Raiva: comprometimento do microambiente meningeal

Casos	Congestão	Inflamação	Meningite
N320/04	presente	3	discreta e focal
N321/04	presente	1	discreta e focal
N322/04	presente	3	moderada e difusa
N323/04	presente	2	discreta e focal
N331/04	ausente	1	ausente
N355/05	presente	2	discreta e focal
N360/05	presente	2	moderada e difusa
N361/05	presente	2	moderada e difusa

0: ausente; 1: discreta; 2: moderada; 3: intensa

O infiltrado inflamatório em localização perivascular foi composto por células mononucleares, principalmente linfócitos, preenchendo o espaço de Virchow-Robin, caracterizando perivascularite (Figura 7 B). Encontramos também macrófagos e raros plasmócitos fazendo parte desse infiltrado. Foi notada congestão vascular em graus variados na maioria dos casos.

As alterações neuronais encontradas no microambiente intraparenquimatoso foram: neuronofagia, cromatólise central (Figura 7 C), contração, tumefação e desaparecimento neuronal, além da presença de esparsas inclusões virais, caracterizadas pela visualização do corpúsculo de Negri no citoplasma de neurônios (Figuras 7 D e E), apresentando positividade em 75% nos casos de raiva. Com muita frequência foram encontrados neurônios contraídos denominados hialinos (Figura 7 F) que apresentavam núcleos intensamente basofílicos e picnóticos. Também foi observado no parênquima processo inflamatório caracterizado por alguns focos de necrose do neurópilo e a pela presença de nódulos microgliais (Figuras 7 G e H, respectivamente).

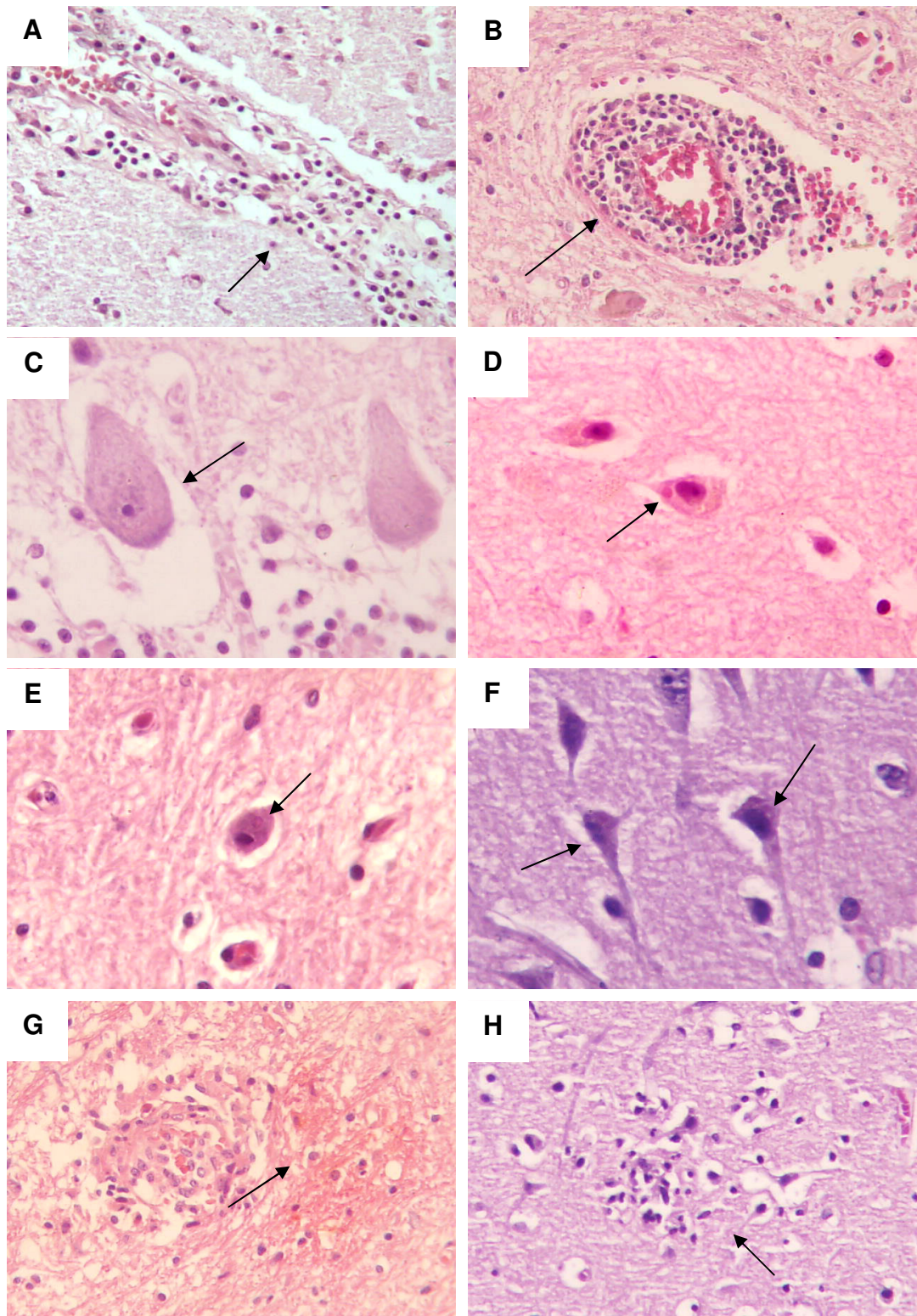


Figure 7. Raiva: alterações histopatológicas pela coloração de HE. **A** - meningite. Magnitude 200 x. **B** - perivascularite. Magnitude 200 x. **C** - cromatólise central. Magnitude 400 x. **D** e **E** - corpúsculo de Negri. Magnitude 400 x. **F** - neurônios hialinos. Magnitude 400 x. **G** - necrose do neurópilo. Magnitude 200 x. **H** - nódulo microglial. Magnitude 200 x

5.3 Avaliação imuno-histoquímica

A avaliação da imunomarcção nos fragmentos de SNC através da técnica de imuno-histoquímica foi considerada positiva pela demonstração de coloração acastanhada, traduzindo os diferentes eventos pesquisados.

Os dados da avaliação quantitativa dos eventos referentes a cada anticorpo por microambiente e região cerebral estão descritos nos anexos B e C.

5.3.1 Expressão antigênica do vírus da raiva no SNC

Não foi encontrada imunomarcção para antígenos do vírus da raiva no microambiente meningeal.

A presença de material antigênico do vírus da raiva foi identificada de maneira inequívoca no citoplasma de células endoteliais em 75% dos casos, detectando-se também imunomarcção em células mononucleadas participantes do infiltrado inflamatório perivascular.

Ao avaliarmos as populações de neurônios e de células da glia que expressavam antígenos do vírus da raiva, constatamos que os neurônios estavam mais imunomarcados que as células da glia, apresentando diferença estatisticamente significativa (Gráfico 2). Entre as células da glia aquelas com morfologia de astrócitos foram as mais freqüentemente marcadas em todos os casos examinados. Os oligodendrócitos expressaram

com menor frequência antígenos da raiva, sendo as células da microglia as mais esparsamente marcadas.

Em relação às diferentes regiões do SNC, em nossa casuística, embora não pudéssemos demonstrar diferenças estatisticamente significantes entre as mesmas, observamos um aparente aumento da imunomarcção dos neurônios na região do córtex parietal, seguido pelo bulbo e pelo cerebelo. As células da glia também não mostraram diferenças estatísticas entre as regiões (Gráfico 3).

Através da imunomarcção com anticorpo anti-raiva pudemos visualizar não só material antigênico granular distribuído de maneira multifocal e irregular no corpo e nos prolongamentos neuronais (Figura 8 A), como também identificar nitidamente a imunomarcção representando agregados antigênicos maiores, bem delimitados, caracterizando os corpúsculos de Negri (Figura 8 B). Além dos neurônios, observamos células da glia com morfologia de astrócitos (Figura 8 C), células mononucleares na luz vascular (Figura 8 D) e células endoteliais (Figura 8 E) também imunomarcadas com o antígeno da raiva. A figura 8 F demonstra cérebro normal com o anticorpo anti-raiva (controle negativo).

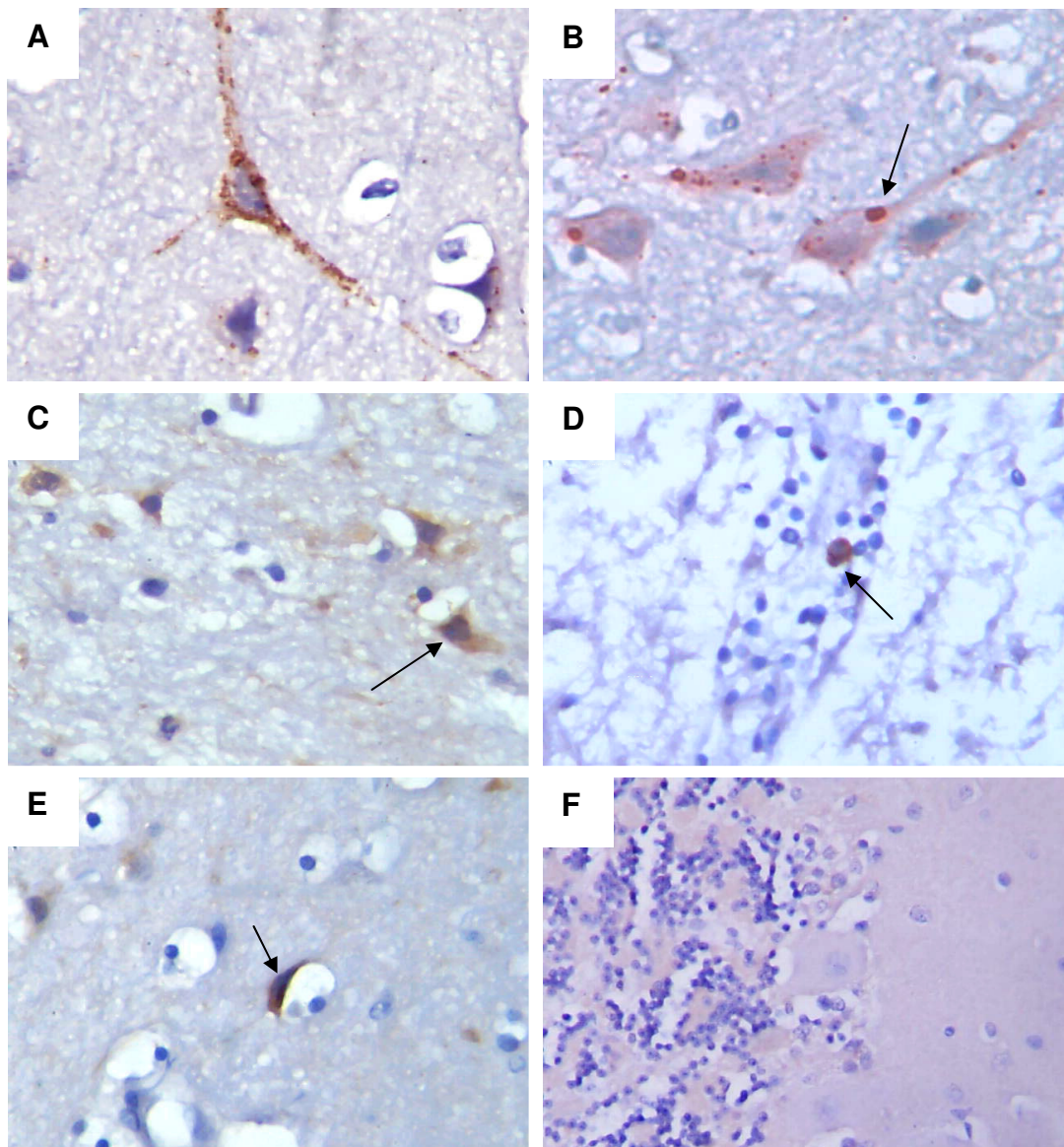


Figura 8. Raiva: reação imuno-histoquímica demonstrando antígeno da raiva. **A** - material antigênico no corpo e nos prolongamentos neuronais. Magnitude 400x. **B** - corpúsculos de Negri. Magnitude 400x. **C** - células da glia com morfologia de astrócitos. Magnitude 400x. **D** - célula mononuclear na luz vascular. Magnitude 400x. **E** - célula endotelial. Magnitude 400x. **F** - cérebro normal com anticorpo anti-raiva (controle negativo). Magnitude 400x

Gráfico 2 - Raiva: neurônios e células da glia imunomarcados com o vírus da raiva por mm^2 no microambiente intraparenquimatoso. Teste não-paramétrico Mann-Whitney

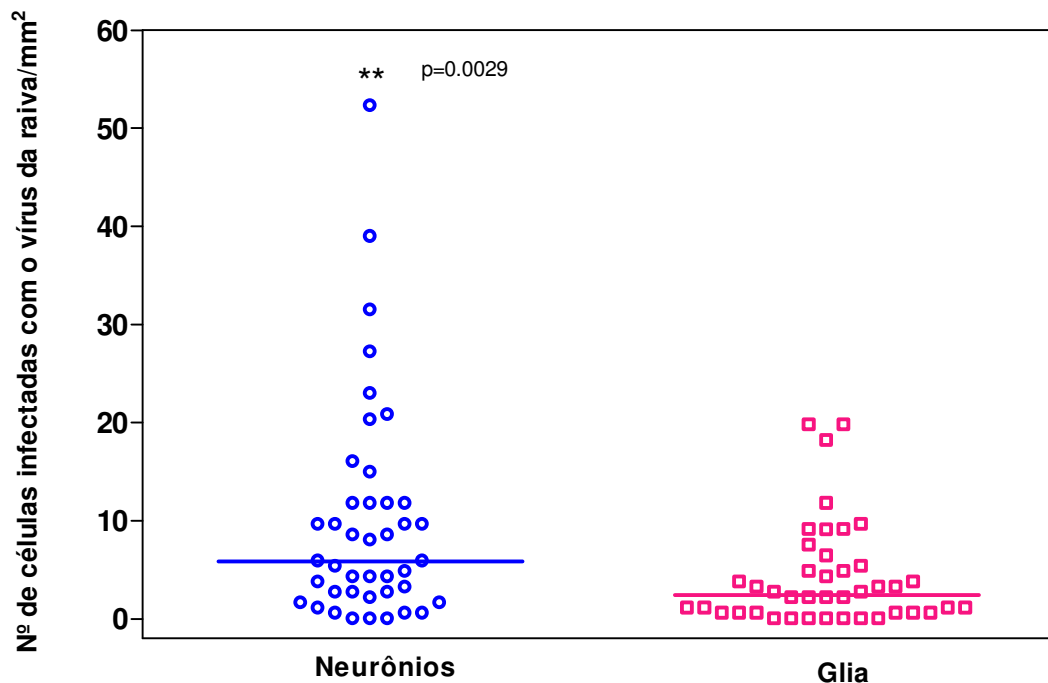
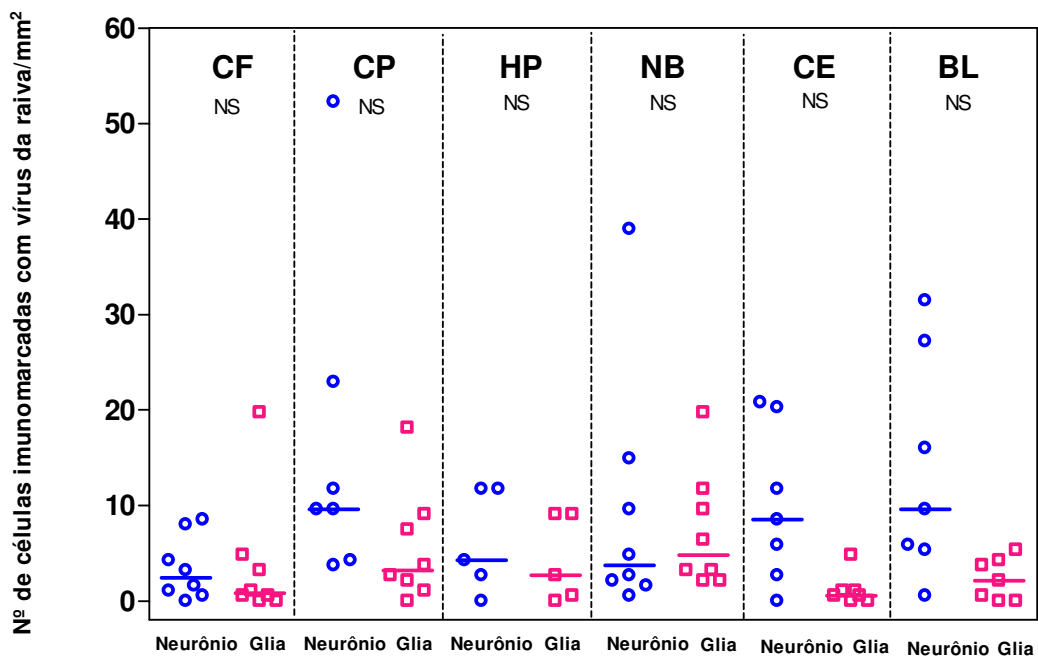


Gráfico 3 - Raiva: neurônios e células da glia imunomarcados com o vírus da raiva por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região parahipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não paramétrico Kruskal-Wallis



5.3.2 Expressão do antígeno do vírus da raiva em astrócitos e células endoteliais através de reação imuno-histoquímica de dupla marcação

Nós evidenciamos através de reação imuno-histoquímica de dupla marcação a presença de antígeno da raiva em astrócitos (Figura 9 A) e células endoteliais (Figura 9 B).

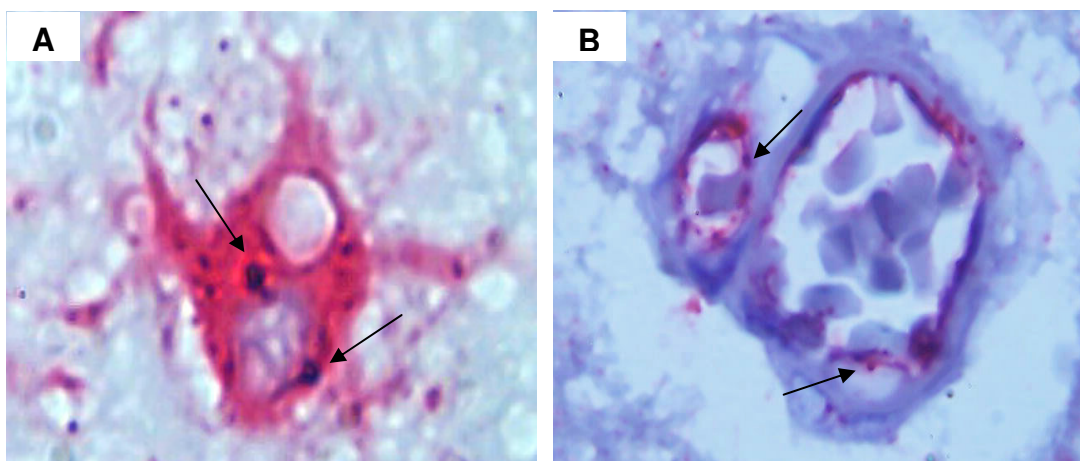


Figura 9. Reação imuno-histoquímica de dupla marcação. **A** - astrócitos em vermelho e vírus da raiva em negro (setas). **B** - célula endotelial em vermelho e vírus da raiva em negro (setas). Magnitude 1000 x

5.3.3 Linfócitos TCD4+ por microambiente e região do SNC

Os linfócitos TCD4+ estiveram diminuídos no microambiente intraparenquimatoso nos casos de raiva em relação ao grupo controle (Figura 10, Gráfico 4). Não houve diferenças estatisticamente significantes na expressão dos linfócitos TCD4+ entre os casos de raiva e o grupo controle quando foi comparada cada região do SNC (Gráfico 5).

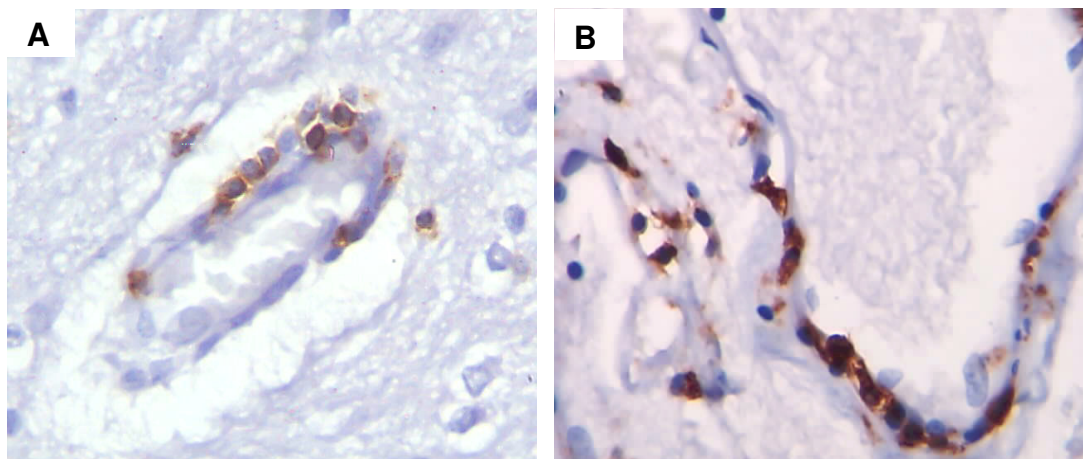


Figura 10. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para linfócitos TCD4+. **A** - linfócitos TCD4+ imunomarcados na infecção rábica. **B** - linfócitos TCD4+ imunomarcados no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 4 - Raiva e grupo controle: linfócitos TCD4+ imunomarcados por mm^2 nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

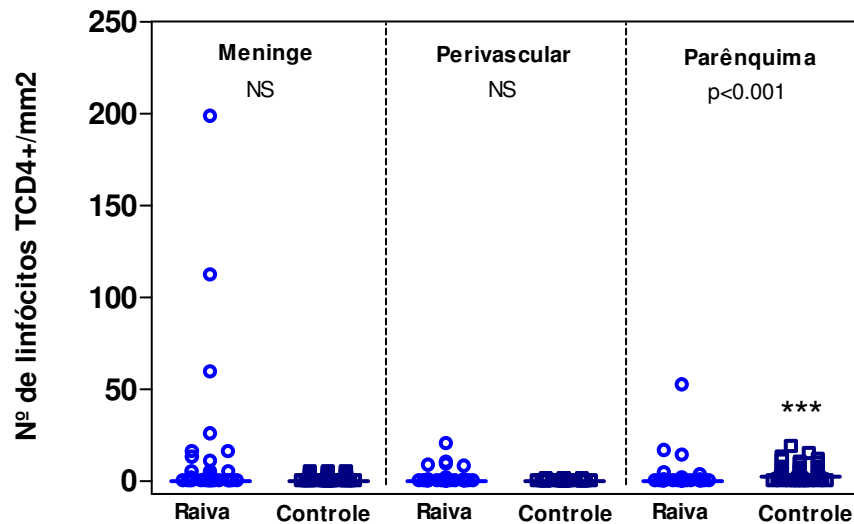
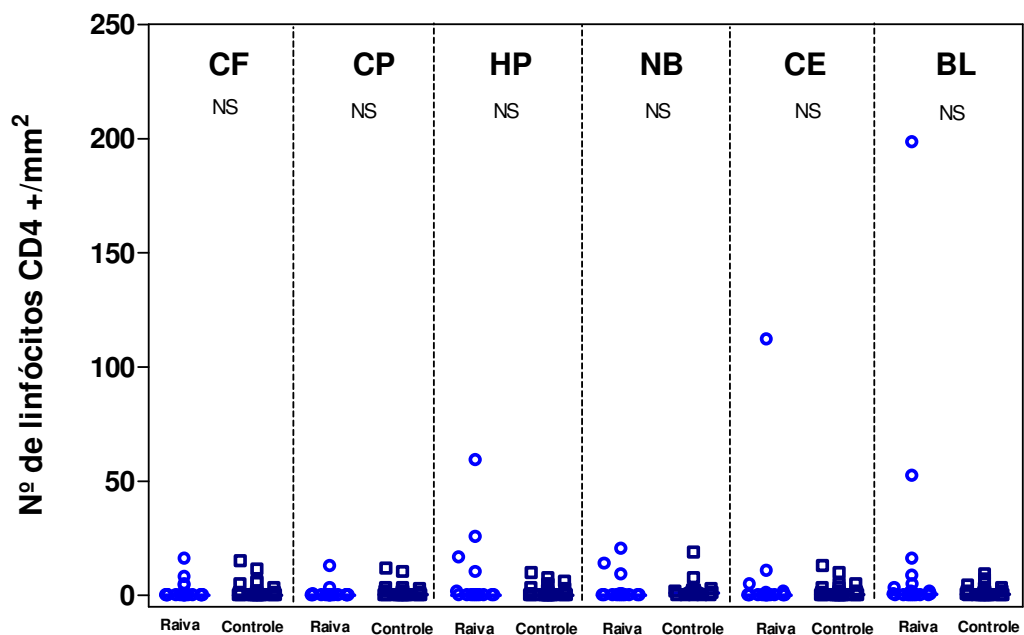


Gráfico 5 - Raiva e grupo controle: linfócitos TCD4+ imunomarcados por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebello. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.4 Linfócitos TCD8+ por microambiente e região do SNC

Os linfócitos TCD8+ mostraram-se aumentados nos casos de raiva em relação ao grupo controle nos três microambientes do SNC (Figura 11, Gráfico 6), assim como nas diferentes regiões do SNC, com exceção do cerebelo (Gráfico 7).

Quando comparamos linfócitos TCD8+ com os linfócitos TCD4+, verificamos que na raiva humana paralítica transmitida por morcego há um predomínio de linfócitos TCD8+ ($p < 0.0001$).

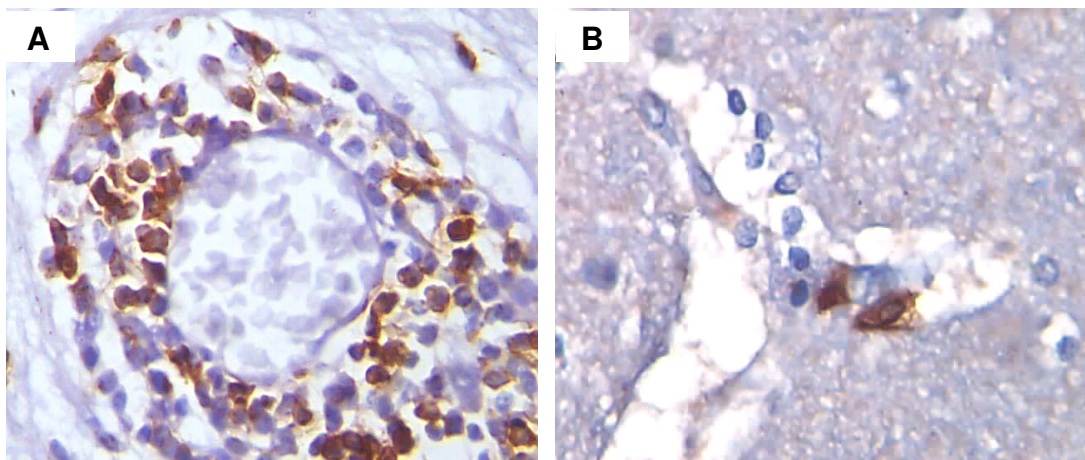


Figura 11. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para linfócitos TCD8+. **A** - linfócitos TCD8+ imunomarcados na infecção rábica. **B** - linfócitos TCD8+ imunomarcados no grupo controle. Magnitude 400x

Gráfico 6 - Raiva e grupo controle: linfócitos TCD8+ imunomarcados por mm^2 nos três microambientes do SNC. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

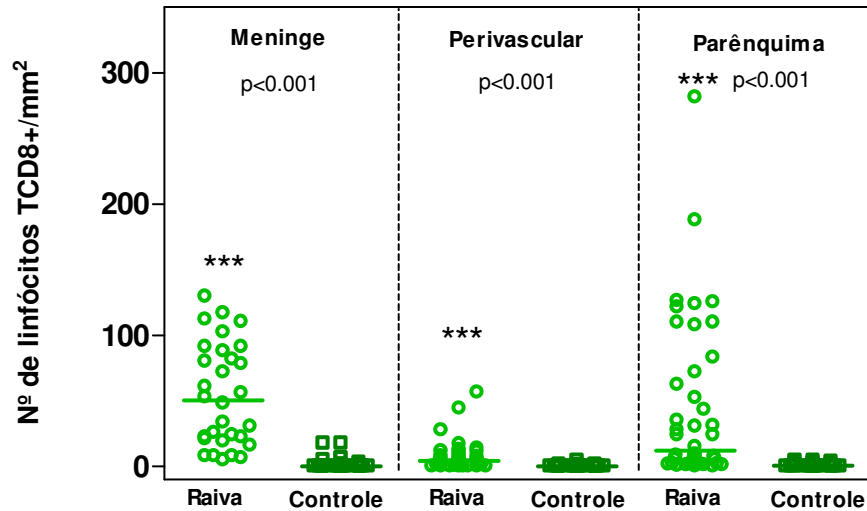
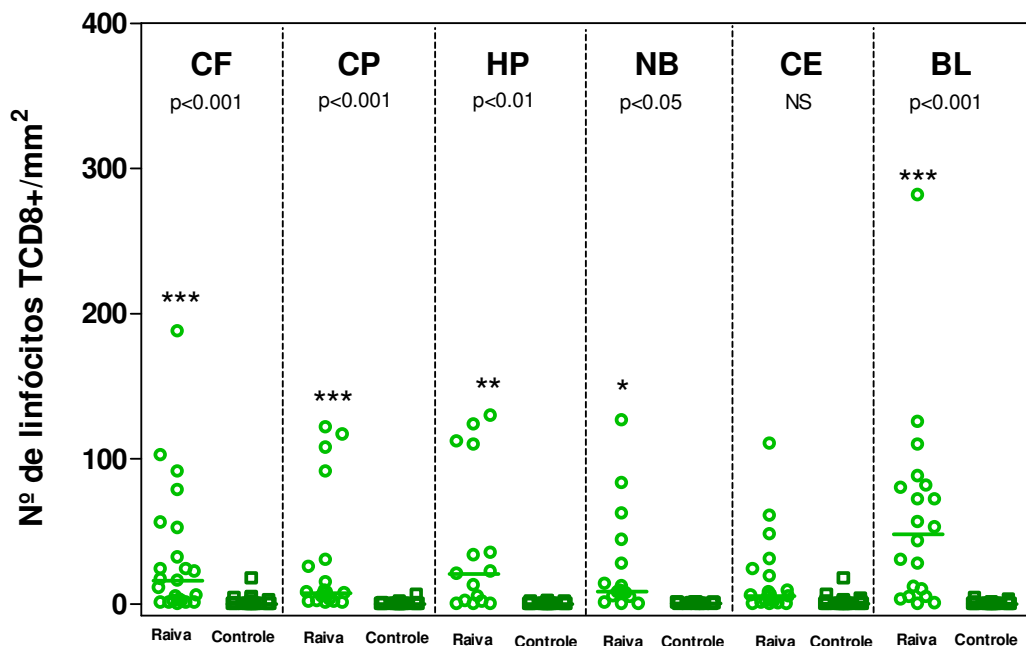


Gráfico 7 - Raiva e grupo controle: linfócitos TCD8+ imunomarcados por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.5 Linfócitos B por microambiente e região do SNC

Verificamos que os linfócitos B nos três microambientes predominaram nos casos de raiva em relação ao grupo controle (Figura 12, Gráfico 8).

Em relação às diferentes regiões do SNC observamos diferenças entre os dois grupos no hipocampo, nos núcleos da base e no bulbo (Gráfico 9).

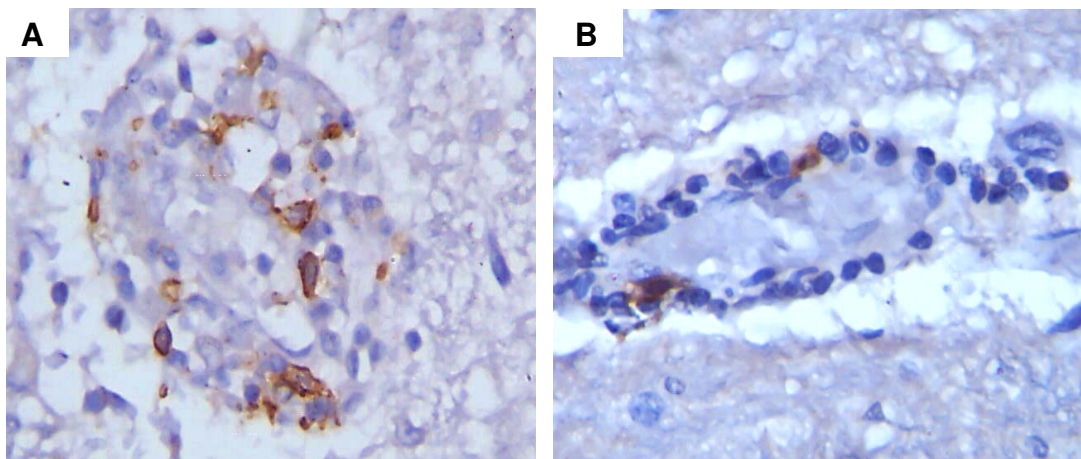


Figura 12. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para linfócitos B. **A** - linfócitos B imunomarcados na infecção rábica. **B** - linfócitos B imunomarcados no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 8 - Raiva e grupo controle: linfócitos B imunomarcados por mm^2 nos três microambientes do SNC. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

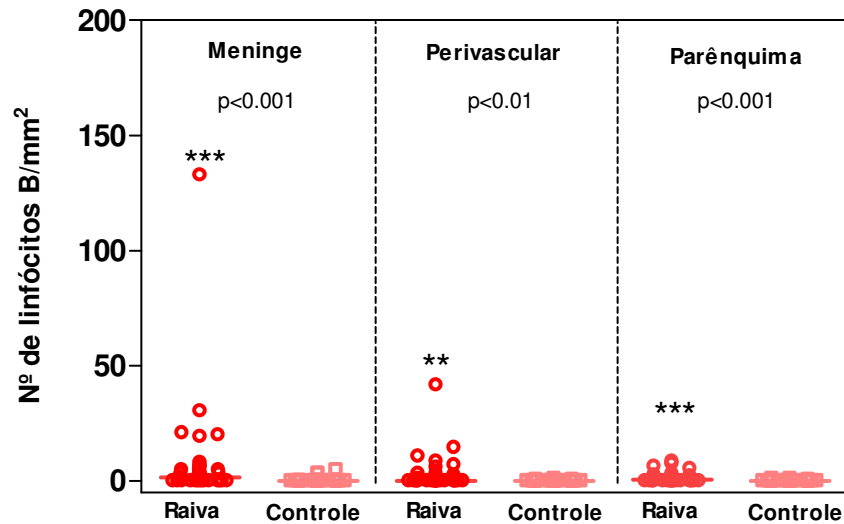
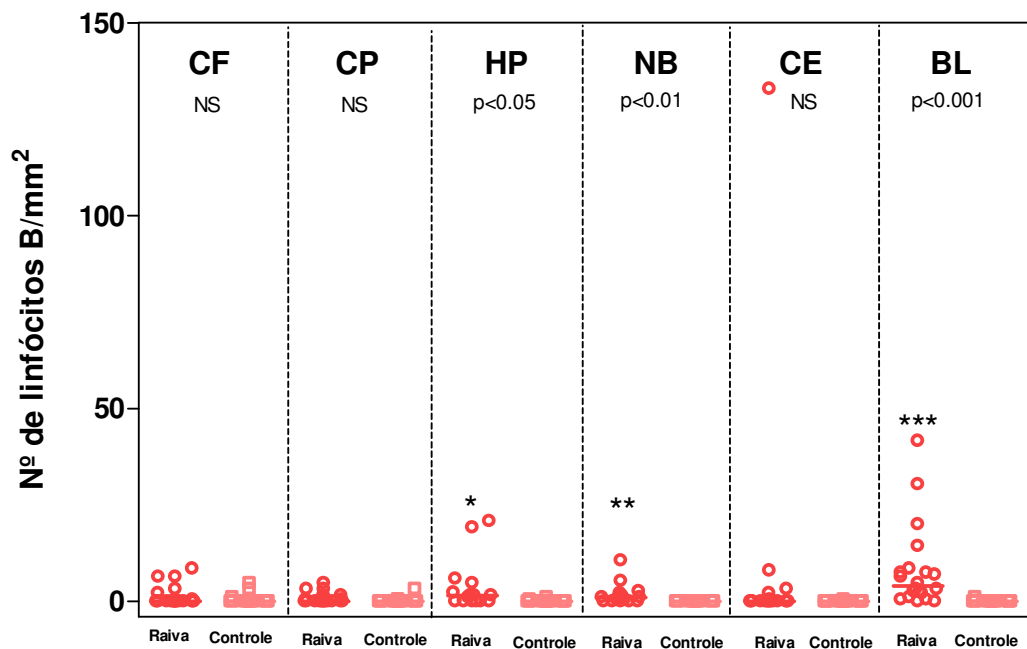


Gráfico 9 - Raiva e grupo controle: linfócitos B imunomarcados por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.6 Células NK por microambiente e região do SNC

As células NK estiveram expressas em número aumentado na raiva (Figura 13) em relação ao grupo controle, na meninge no que se refere ao microambiente (Gráfico 10) e nos núcleos da base quando analisamos as regiões do SNC (Gráfico 11).

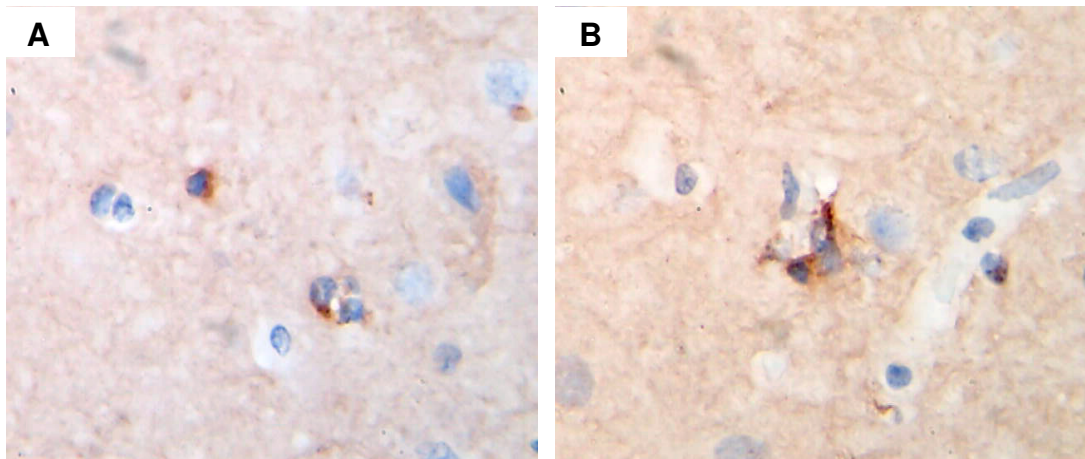


Figura 13. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células NK. **A** - células NK imunomarcadas no parênquima cerebral no grupo infectado. **B** - células NK imunomarcadas no parênquima cerebral, no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 10 - Raiva e grupo controle: células NK imunomarcadas por mm^2 nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

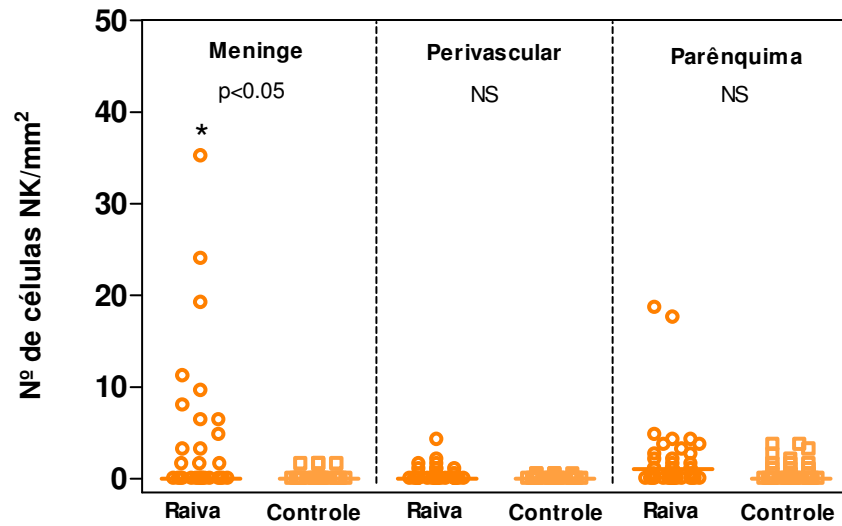
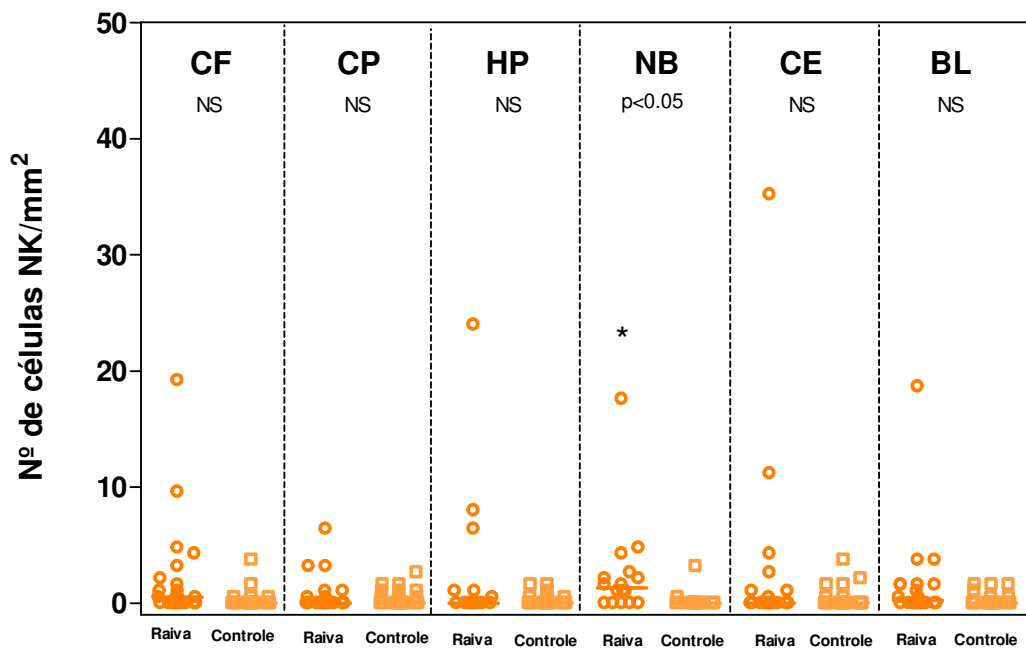


Gráfico 11 - Raiva e grupo controle: células NK imunomarcadas por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.7 Macrófagos CD68+ por microambiente e região do SNC

Constatamos que macrófagos CD68+ no microambiente meningeal predominaram de modo significativo nos casos de raiva em relação aos controles (Gráfico 12) e no bulbo quanto se considerou as regiões do SNC (Figura 14, Gráfico 13).

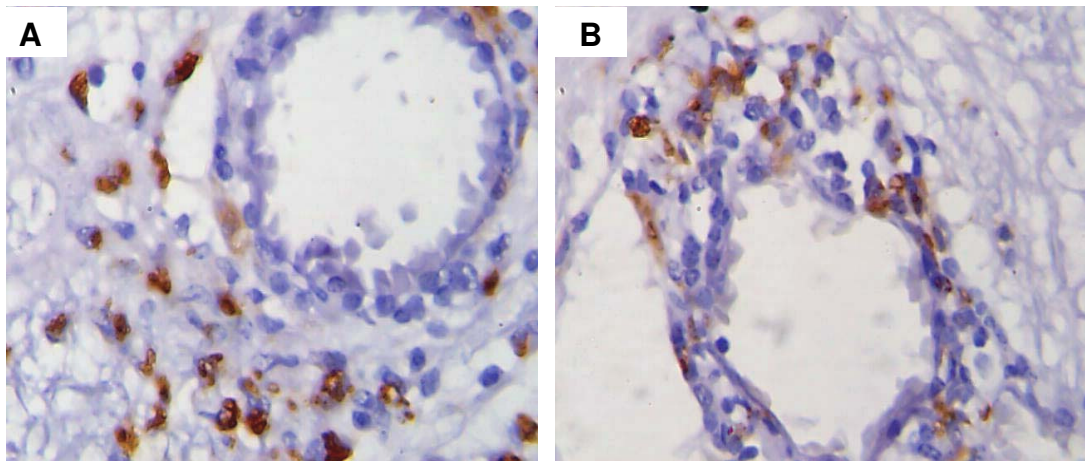


Figura 14. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para macrófagos CD68+. **A** - macrófagos CD68+ imunomarcados na infecção rábica. **B** - macrófagos CD68+ imunomarcados no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 12 - Raiva e grupo controle: macrófagos CD68+ imunomarcados por mm^2 nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

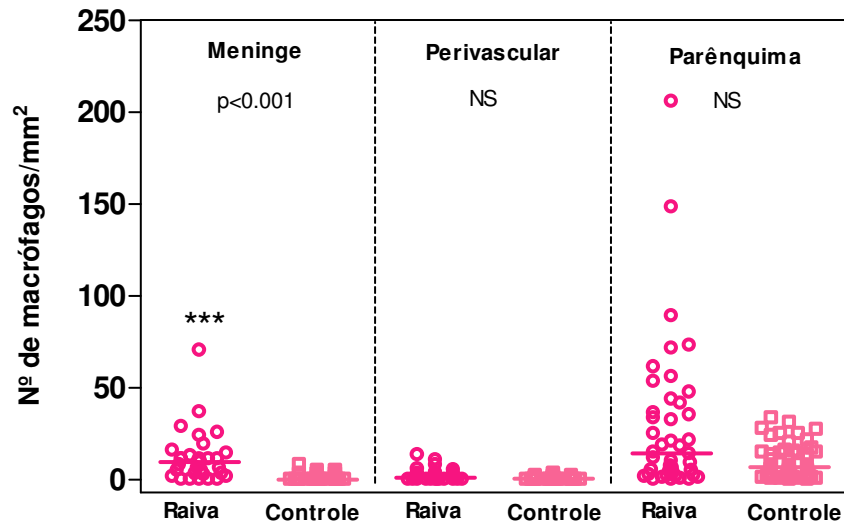


Gráfico 13 - Raiva e grupo controle: macrófagos CD68+ imunomarcados por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.8 Astrócitos por microambiente e região do SNC

Os astrócitos mostraram-se aumentados em número nos casos de raiva no SNC (Figura 15, Gráfico 14) e não apresentaram diferenças estatisticamente significantes no que se refere às regiões do SNC (Gráfico 15).

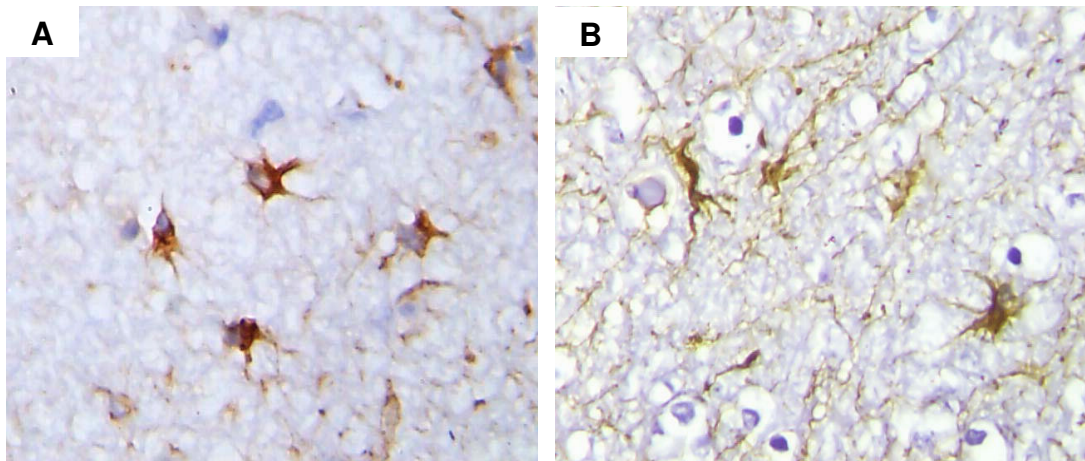


Figura 15. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para astrócitos. **A** - astrócitos imunomarcados na infecção rábica. **B** - astrócitos imunomarcados no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 14 - Raiva e grupo controle: astrócitos imunomarcados por mm^2 no microambiente intraparenquimatoso. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

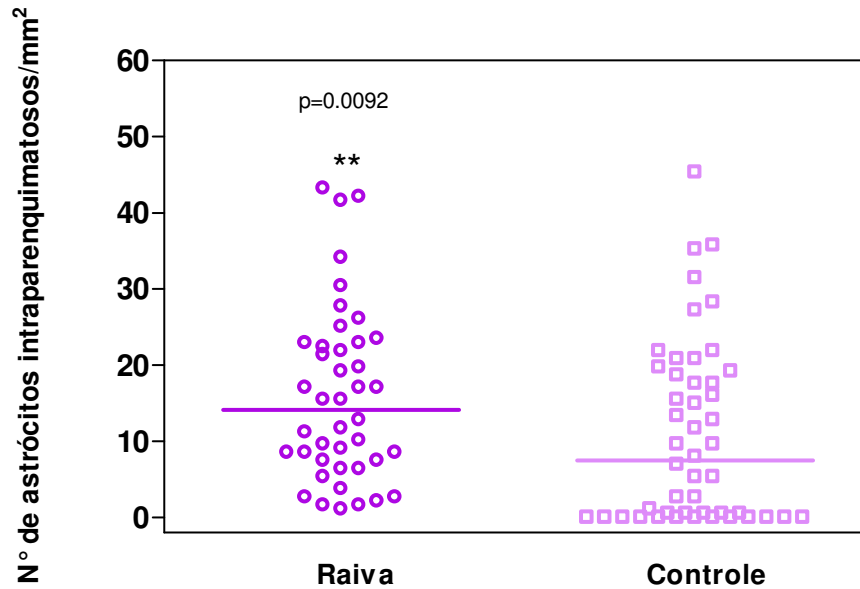
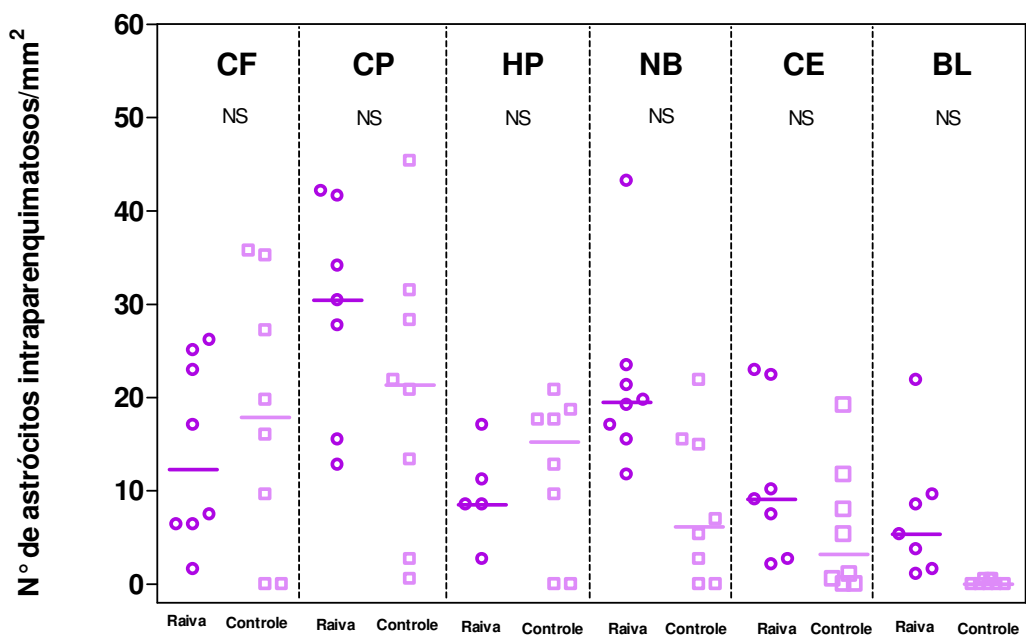


Gráfico 15 - Raiva e grupo controle: astrócitos imunomarcados por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.9 Células expressando TNF- α por microambiente e região do SNC

As células expressando TNF- α estiveram aumentadas nos casos de raiva quando comparadas ao grupo controle nos três microambientes (Figura 16, Gráfico 16).

Em relação às regiões do SNC foi observado um predomínio das células expressando TNF- α nos casos de raiva na região do hipocampo e do bulbo (Gráfico 17).

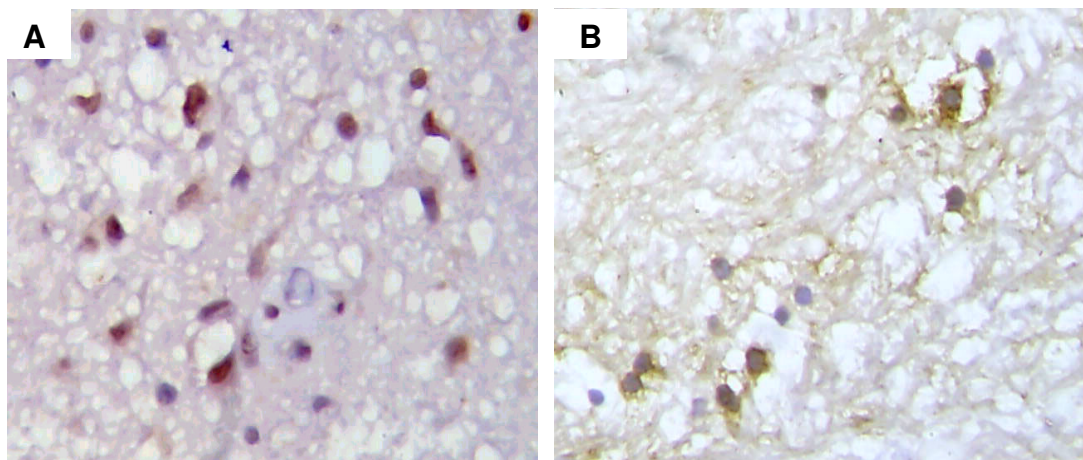


Figura 16. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando TNF- α . **A** - células imunomarcadas expressando TNF- α na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando TNF- α no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 16 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando TNF- α por mm² nos três microambientes do SNC. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

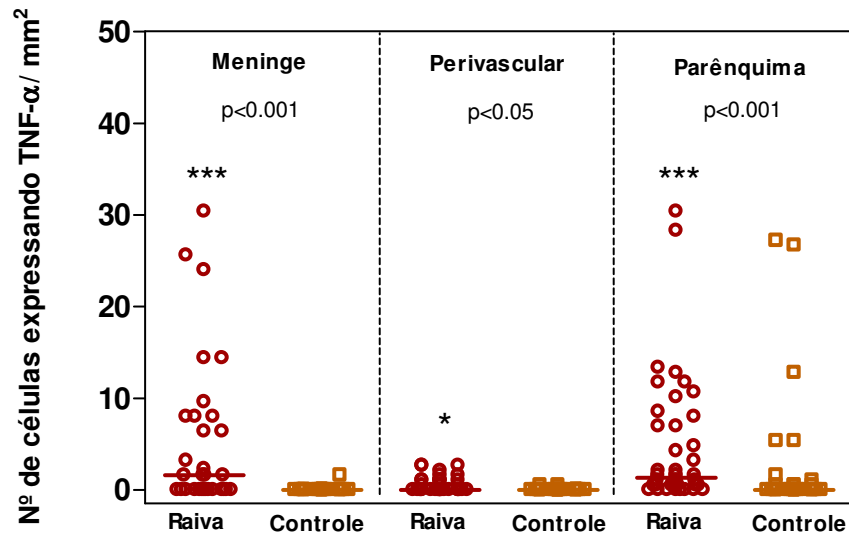
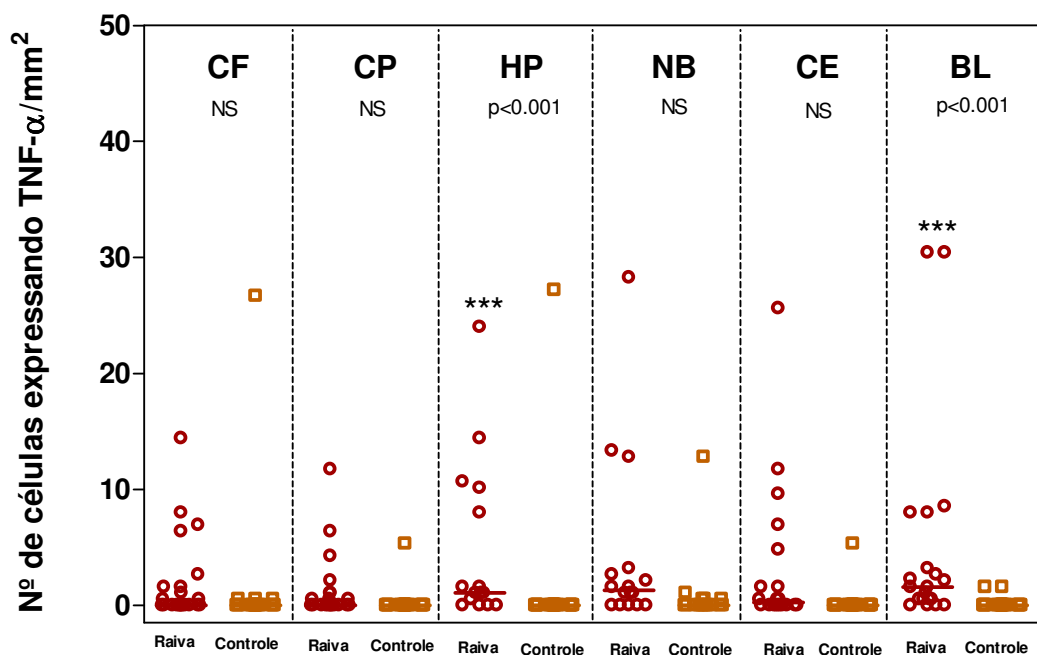


Gráfico 17 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando TNF- α por mm² nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.10 Células expressando IFN- γ por microambiente e região do SNC

A expressão de IFN- γ nos casos de raiva foi muito baixa em todas as contagens efetuadas, aproximando-se daquela verificada no grupo controle. Todavia, no microambiente parenquimatoso houve aumento das mesmas em relação ao grupo controle (Figura 17, Gráfico 18).

Em relação às diferentes regiões do SNC, foi observado aumento de células expressando IFN- γ no grupo da raiva no hipocampo (Gráfico 19).

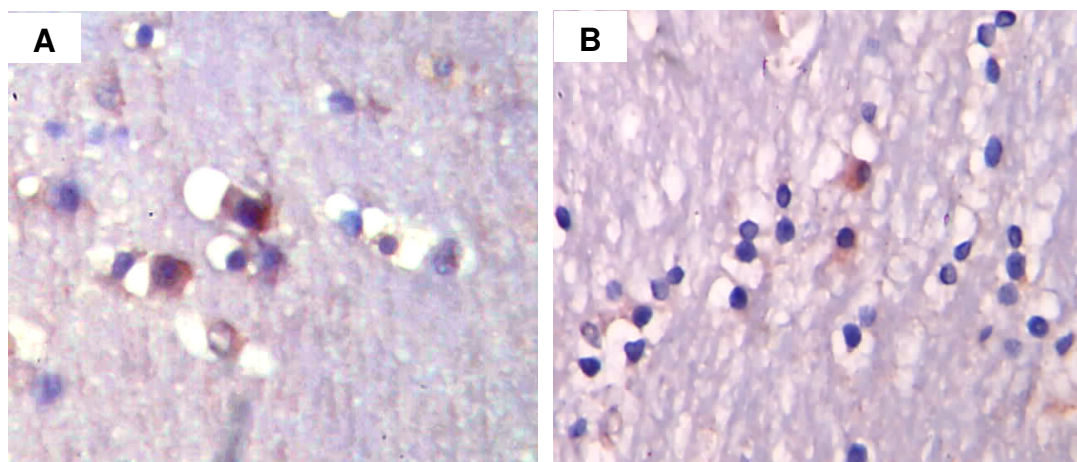


Figura 17. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IFN- γ . **A** - células imunomarcadas expressando IFN- γ na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando IFN- γ no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 18 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IFN- γ por mm² nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

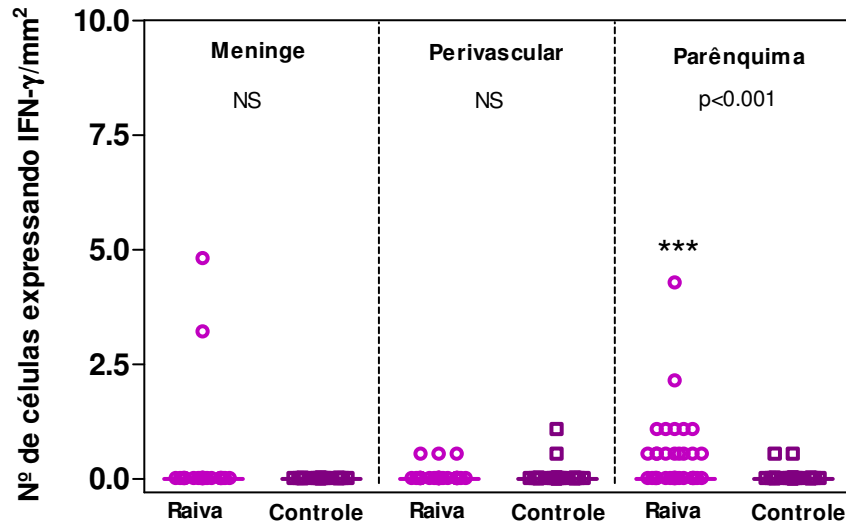
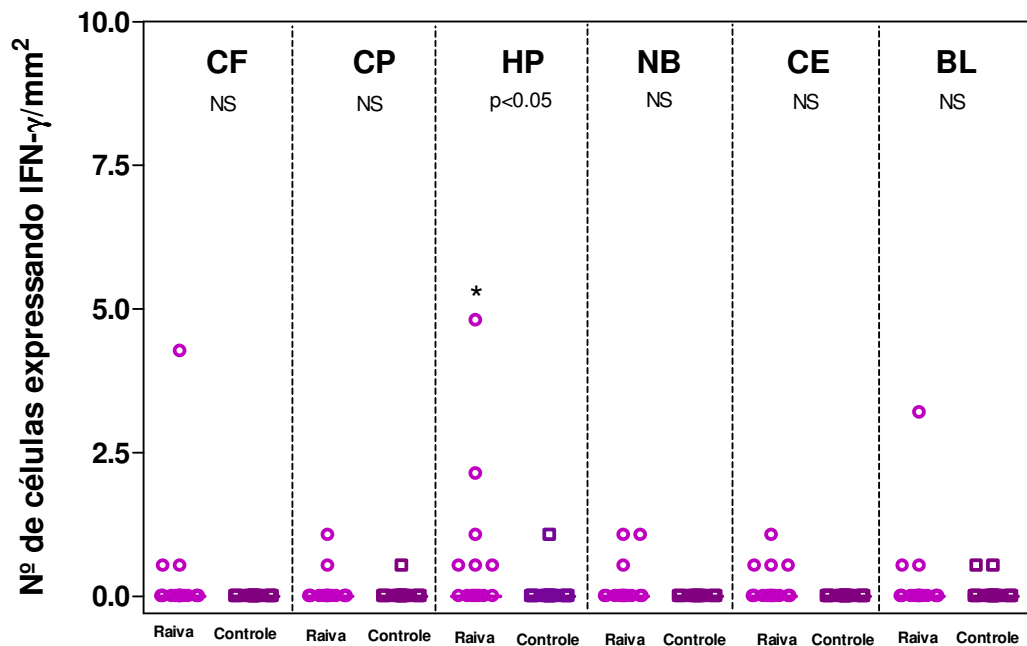


Gráfico 19 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IFN- γ por mm² nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.11 Células expressando TGF- β por microambiente e região do SNC

As células expressando TGF- β estiveram aumentadas no grupo de raiva nos microambientes meningeal e perivascular, quando comparadas ao grupo controle (Figura 18, Gráfico 20).

Em relação às regiões do SNC não houve qualquer diferença entre os dois grupos (Gráfico 21).

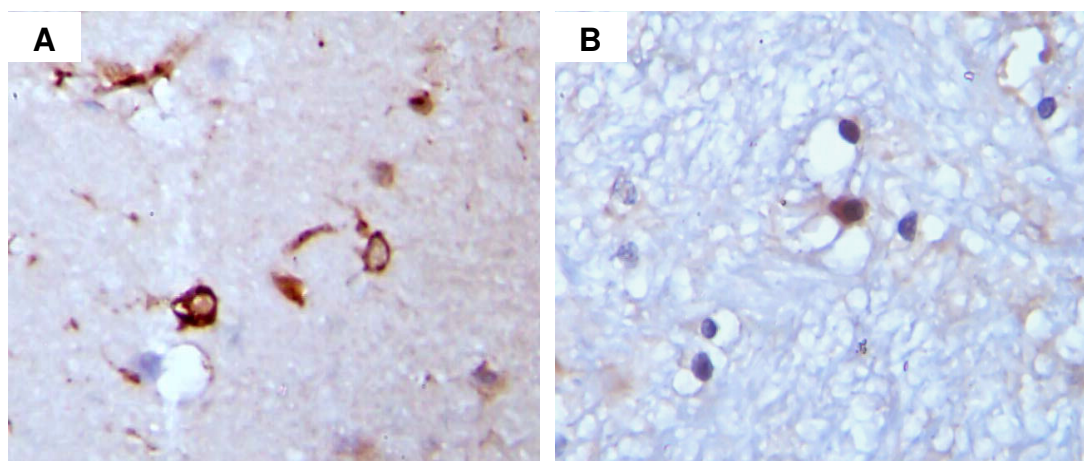


Figura 18. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando TGF- β . **A** - células imunomarcadas expressando TGF- β na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando TGF- β no grupo controle. Magnitude 400x

Gráfico 20 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando TGF- β por mm^2 nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

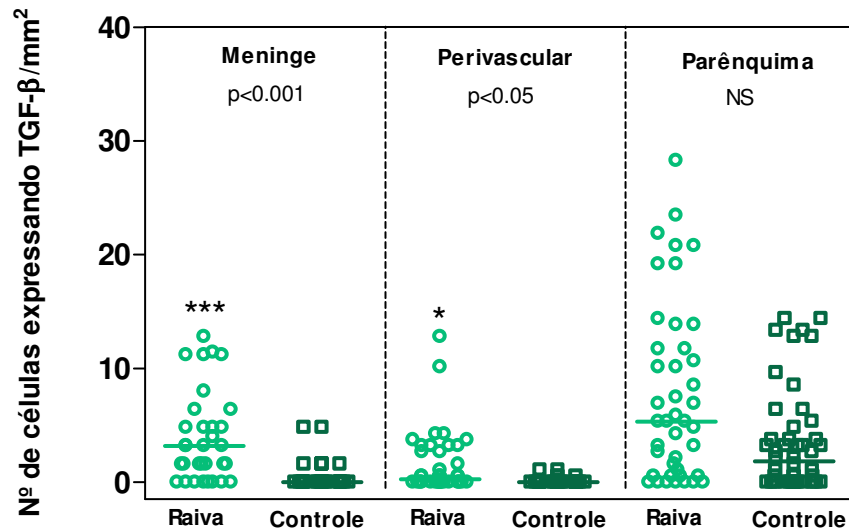
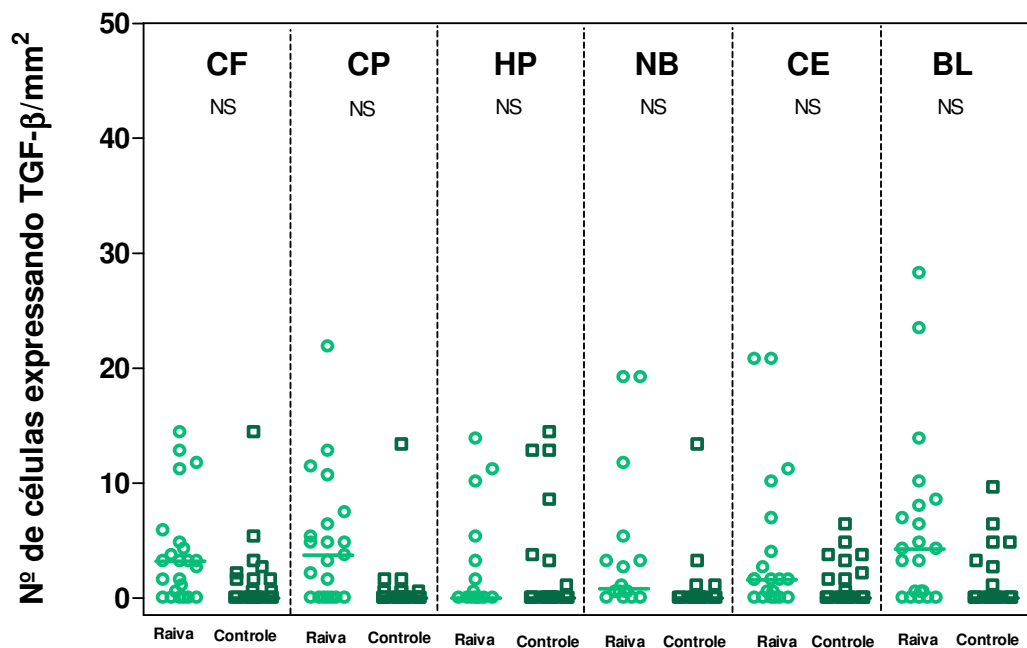


Gráfico 21 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando TGF- β por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.12 Células expressando IL-1 β por microambiente e região do SNC

Quando analisamos as células expressando IL-1 β por microambiente verificamos um aumento dessas células nos casos de raiva na meninge e no ambiente intraparenquimatoso (Figura 19, Gráfico 22).

Em relação às regiões do SNC não foram encontradas diferenças entre os grupos (Gráfico 23).

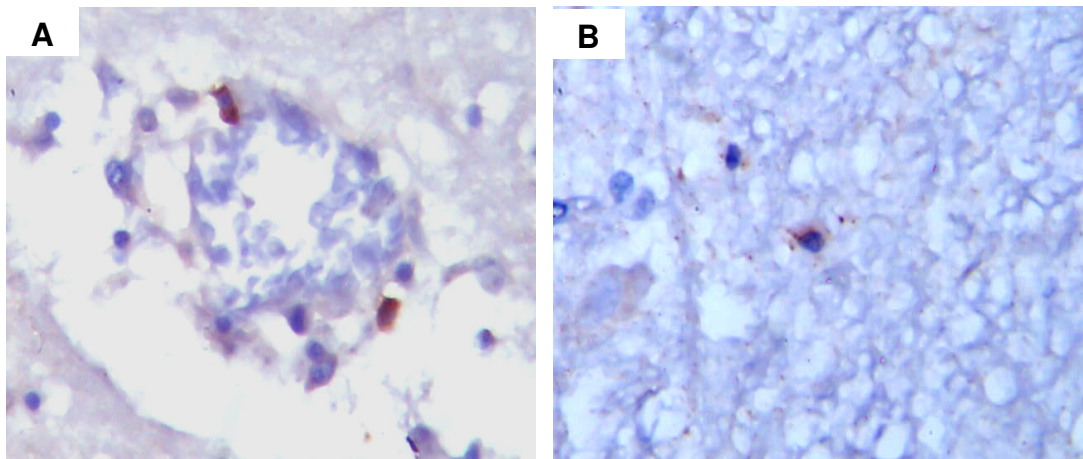


Figura 19. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-1 β . **A** - células imunomarcadas expressando IL-1 β na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando IL-1 β no grupo controle, Magnitude 400 x.

Gráfico 22 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-1 β por mm² nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

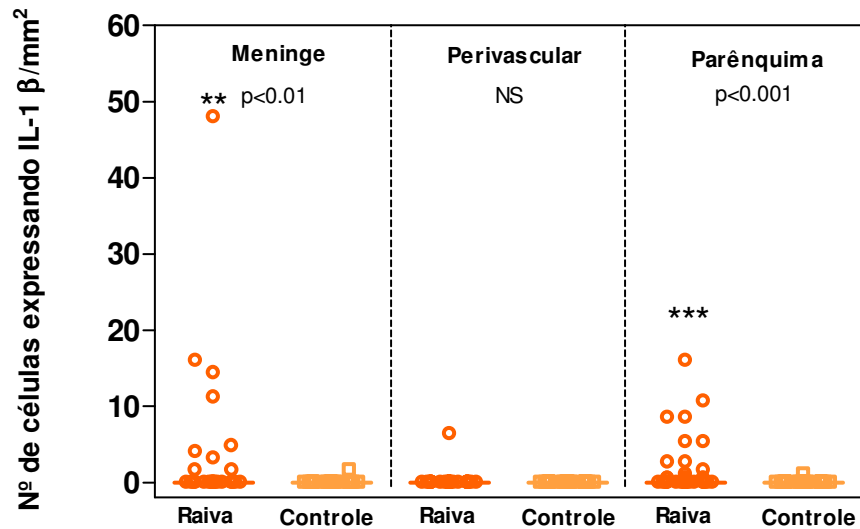
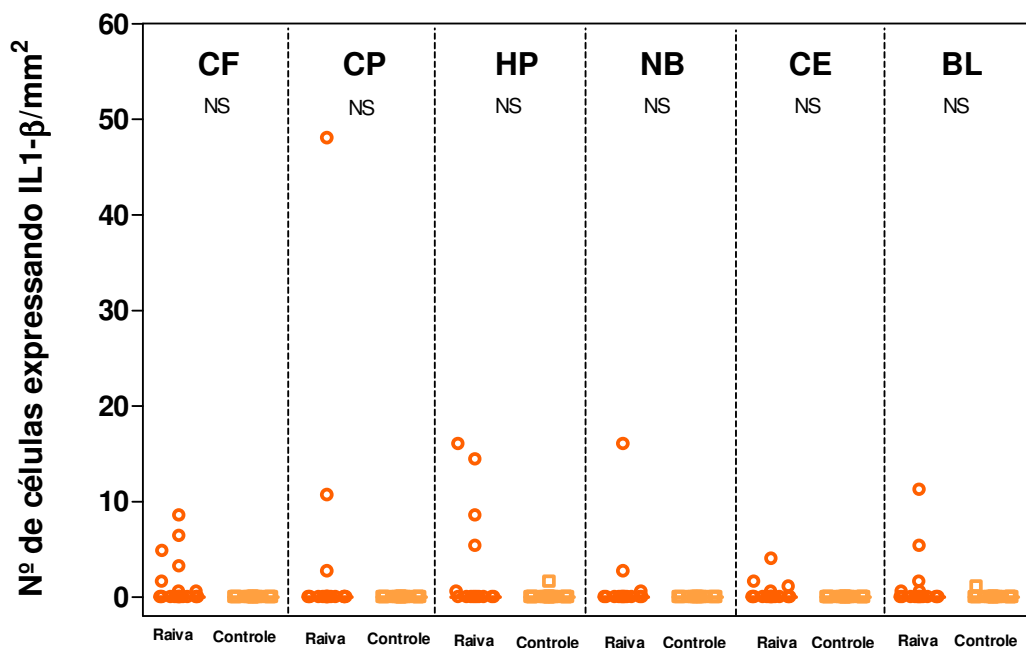


Gráfico 23 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-1 β por mm² nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.13 Células expressando IL-2r por microambiente e região do SNC

A expressão de IL-2r foi muito baixa nos casos de raiva, aproximando-se daquela observada nos casos controles (Figura 20). No microambiente meningeal houve diferença de sua expressão com a do grupo controle (Gráfico 24).

As regiões do SNC não apresentaram diferenças quanto à expressão de IL-2r quando comparamos o grupo de raiva e o grupo controle (Gráfico 25).

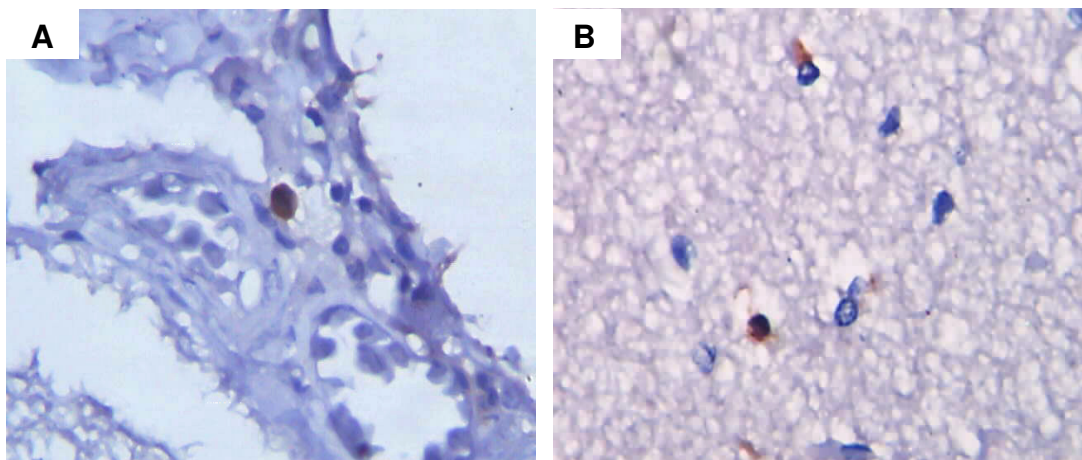


Figura 20. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-2r. **A** - células imunomarcadas expressando IL-2r na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando IL-2r no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 24 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-2r por mm² nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

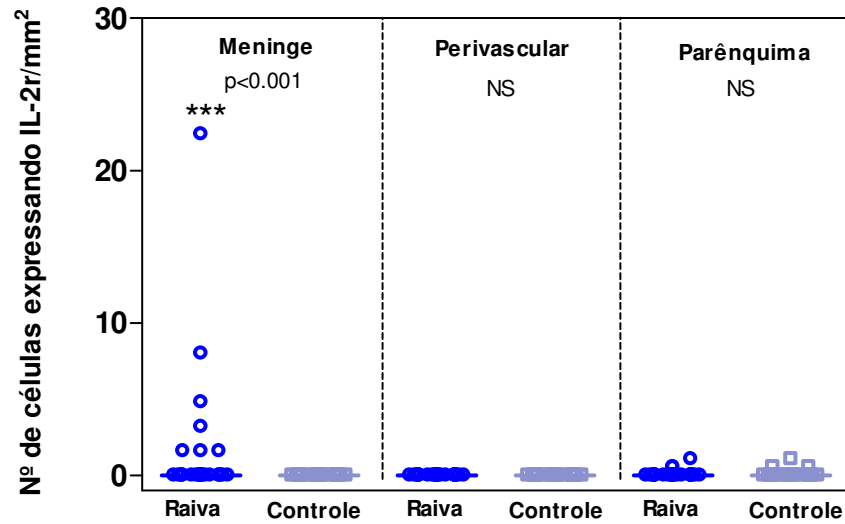
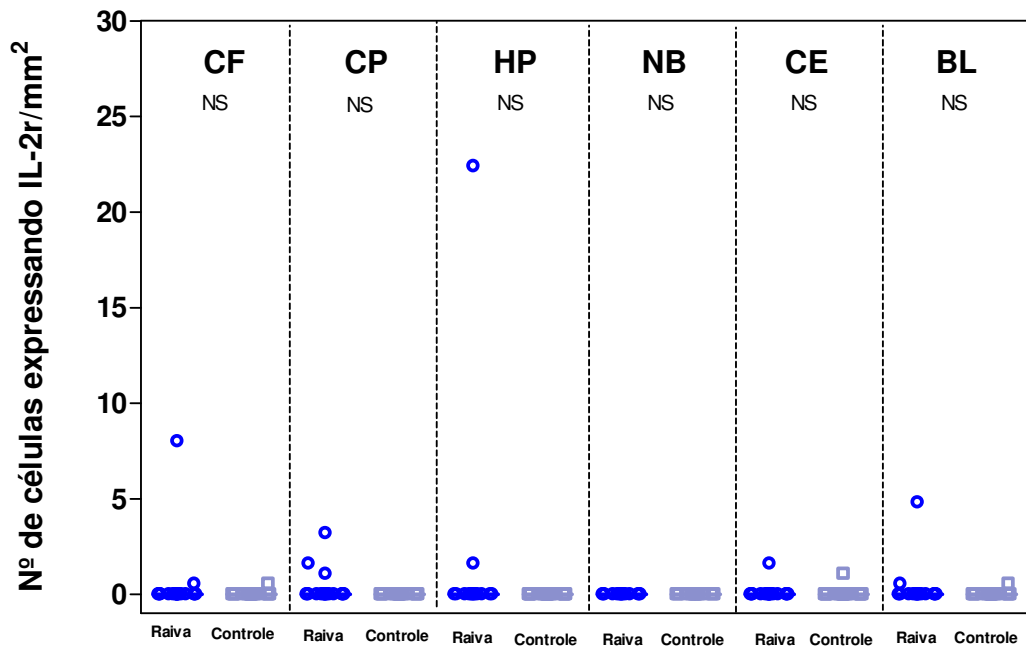


Gráfico 25 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-2r por mm² nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.14 Células expressando IL-4 por microambiente e região do SNC

As células expressando IL-4 estiveram em maior número nos casos de raiva quando comparadas ao grupo controle nos três microambientes do SNC (Figura 21, Gráfico 26).

Em relação às regiões do SNC foi observado um maior número de células expressando IL-4 nos casos de raiva no córtex frontal, hipocampo e bulbo (Gráfico 27).

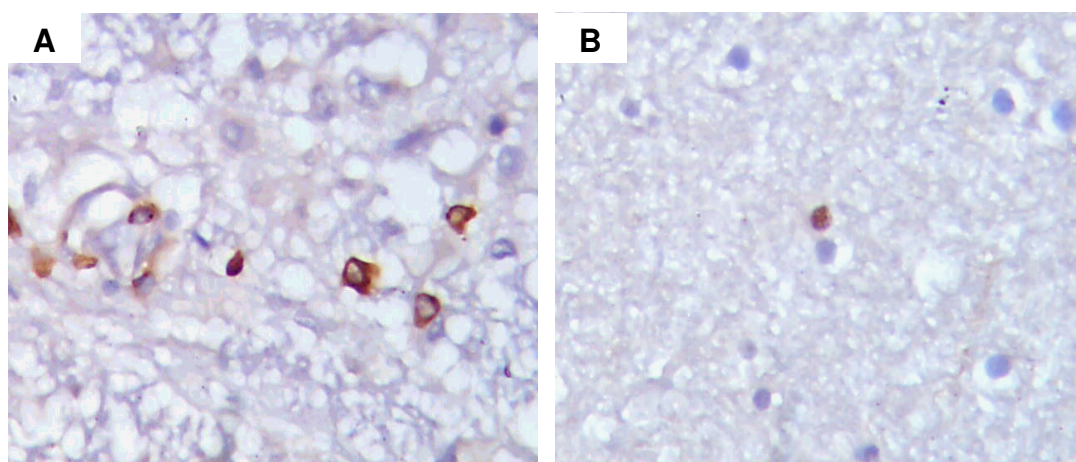


Figura 21. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-4. **A** - células imunomarcadas expressando IL-4 na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando IL-4 no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 26 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-4 por mm² nos três microambientes do SNC. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

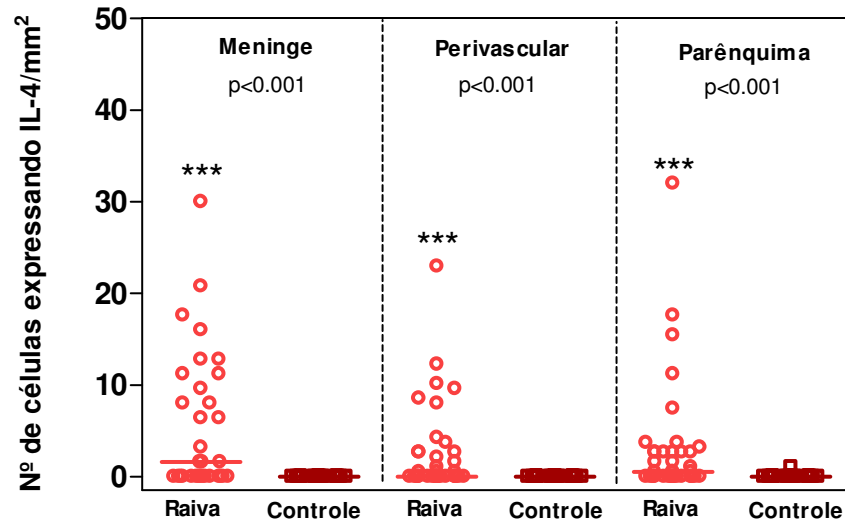
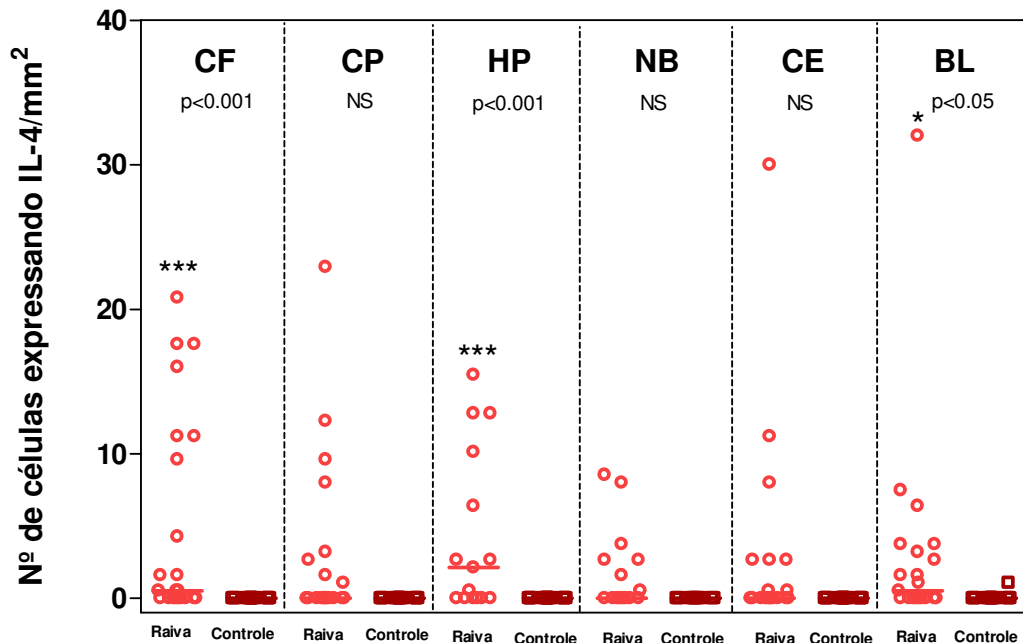


Gráfico 27 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-4 por mm² nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebêlo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.15 Células expressando IL-6 por microambiente e região do SNC

As células expressando IL-6 mostraram-se aumentadas nos casos de raiva nos microambientes meningeal e intraparenquimatoso (Figura 22, Gráfico 28)

Quando analisamos as regiões do SNC observamos diferenças em sua expressão entre os dois grupos somente no hipocampo, com aumento dessas células no grupo da raiva (Gráfico 29).

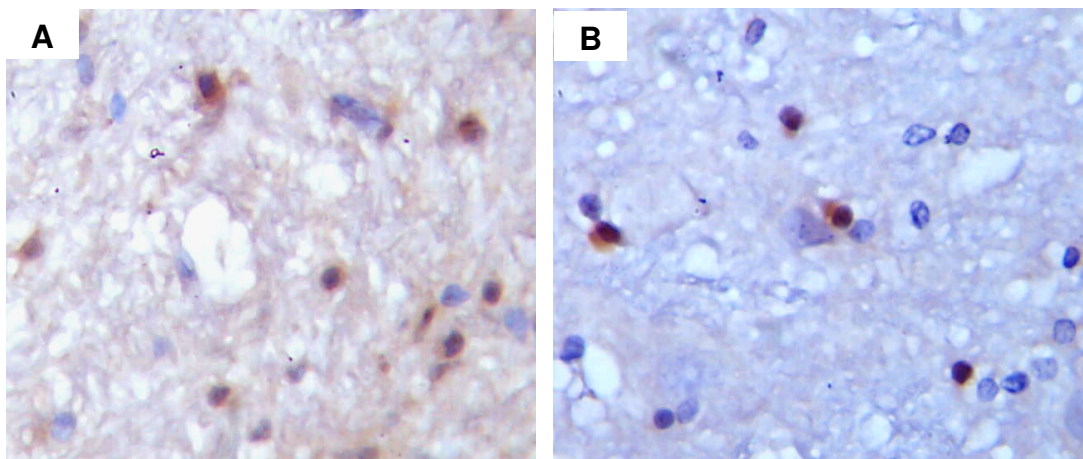


Figura 22. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-6. **A** - células imunomarcadas expressando IL-6 na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando IL-6 no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 28 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-6 por mm² nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

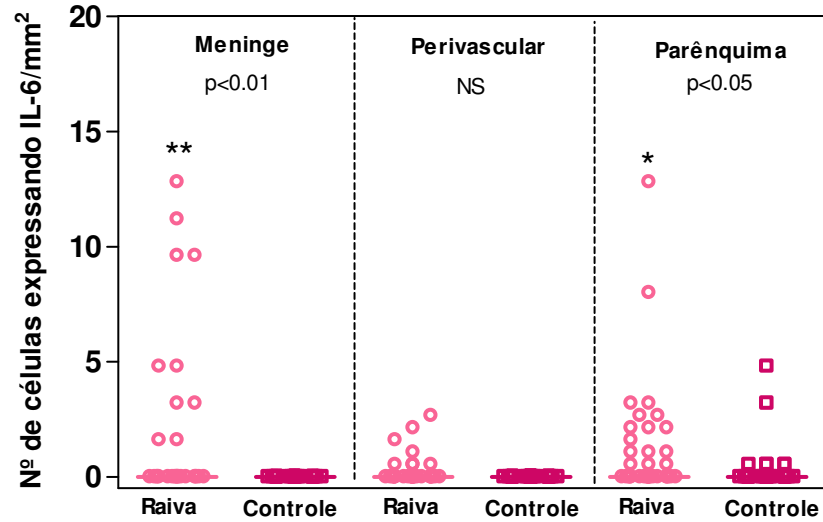
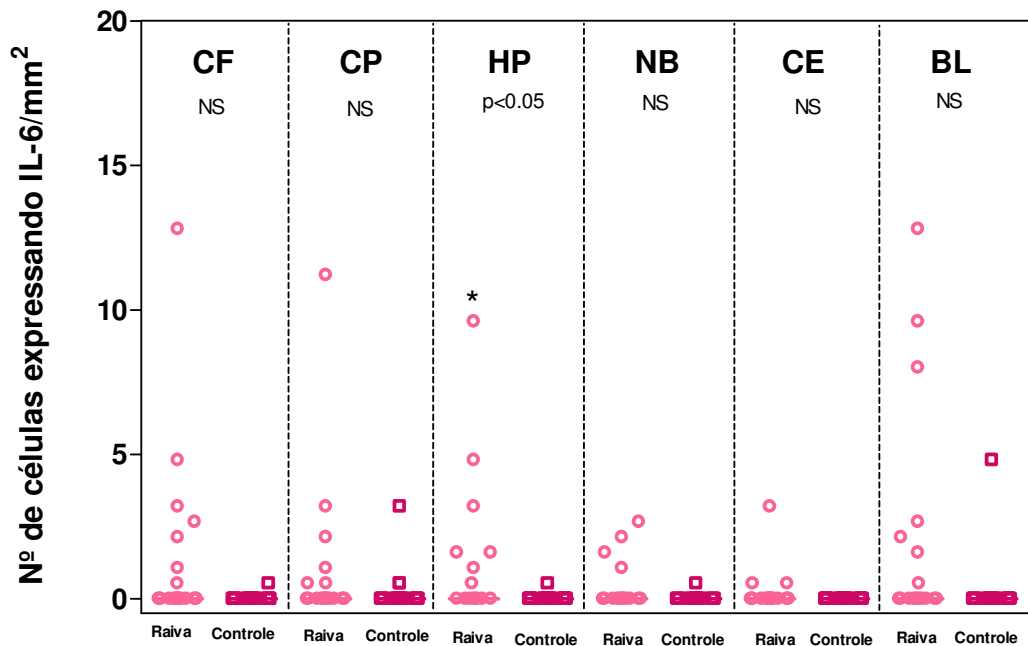


Gráfico 29 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-6 por mm² nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.16 Células expressando IL-10 por microambiente e região do SNC

As células expressando IL-10 estiveram aumentadas nos casos de raiva nos três microambientes (Figura 23, Gráfico 30), assim como nas diferentes regiões do SNC, com exceção do cerebelo que não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos comparados (Gráfico 31).

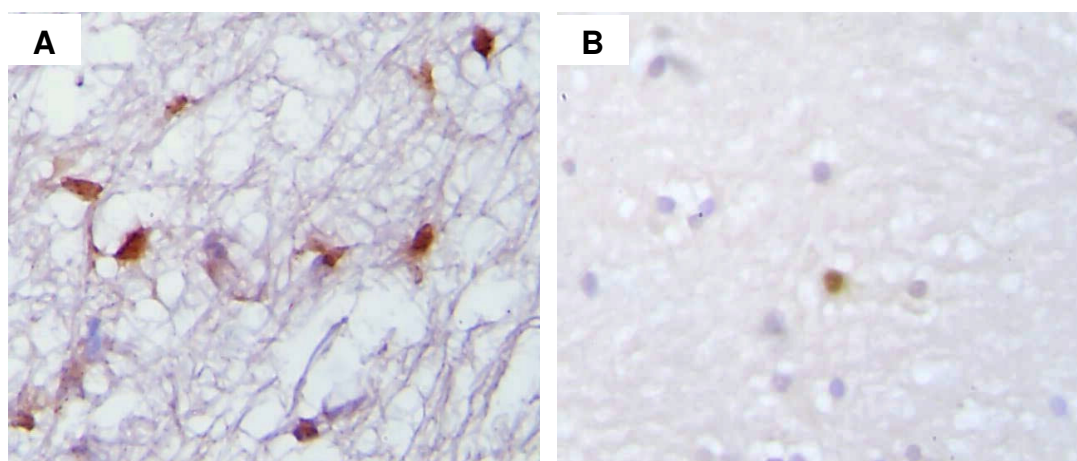


Figura 23. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-10. **A** - células imunomarcadas expressando IL-10 na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando IL-10 no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 30 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-10 por mm² nos três microambientes do SNC. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

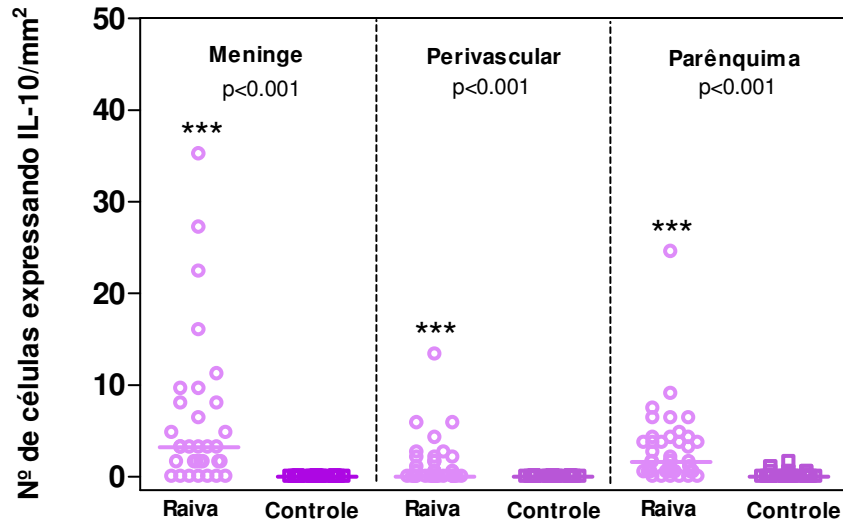
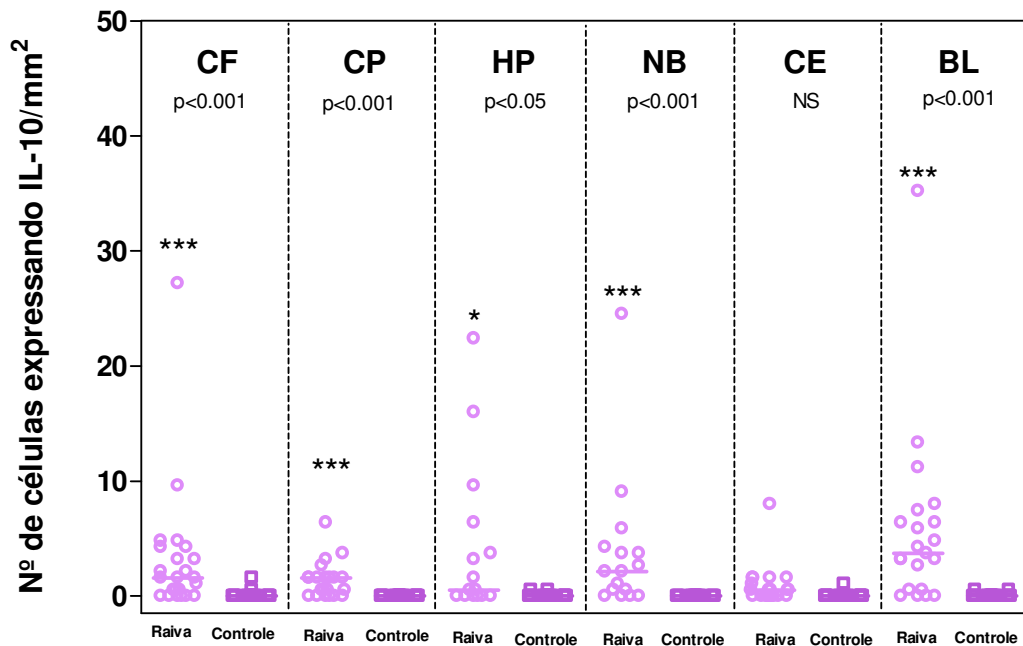


Gráfico 31 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-10 por mm² nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.17 Células expressando IL-12 por microambiente e região do SNC

Células expressando IL-12 estiveram em número aumentado nos microambientes meningeal e intraparenquimatoso (Figura 24, Gráfico 32).

Em relação às regiões do SNC pudemos observar um aumento dessas células nos casos de raiva no hipocampo e no bulbo, quando comparado ao grupo controle (Gráfico 33).

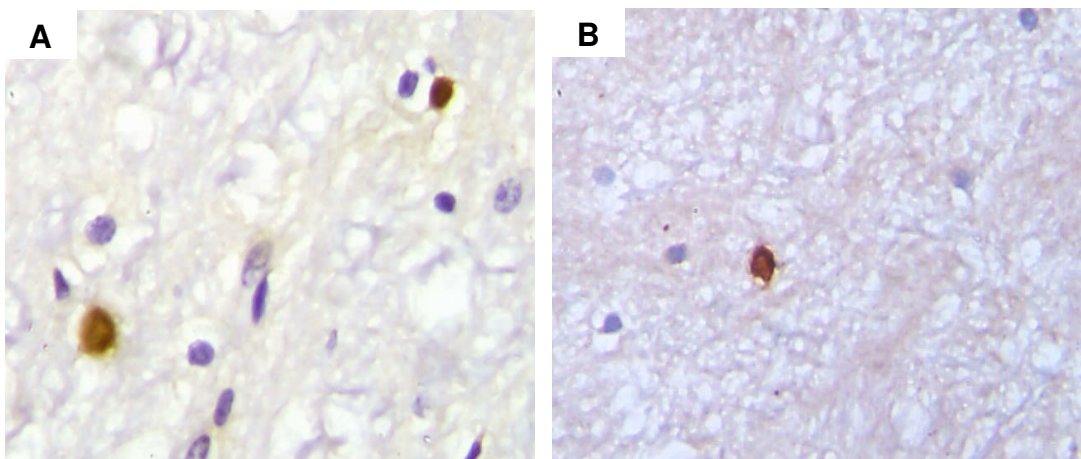


Figura 24. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando IL-12. **A** - células imunomarcadas expressando IL-12 na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando IL-12 no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 32 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-12 por mm^2 nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

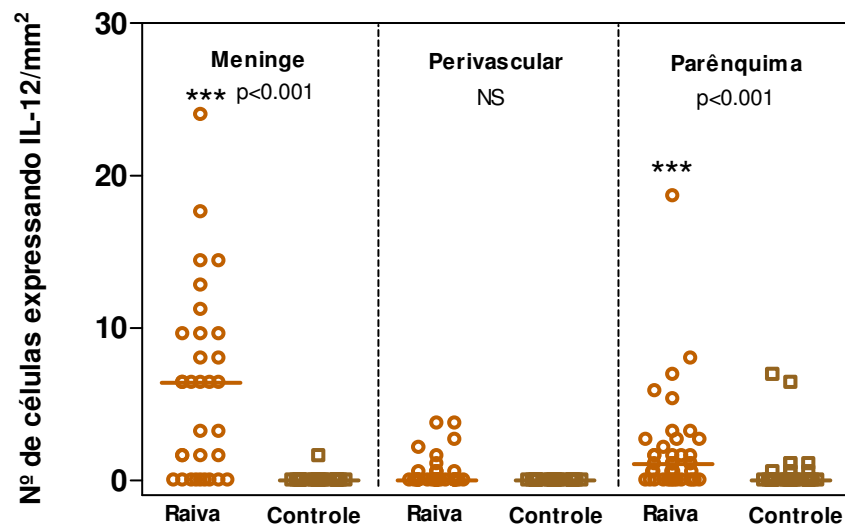
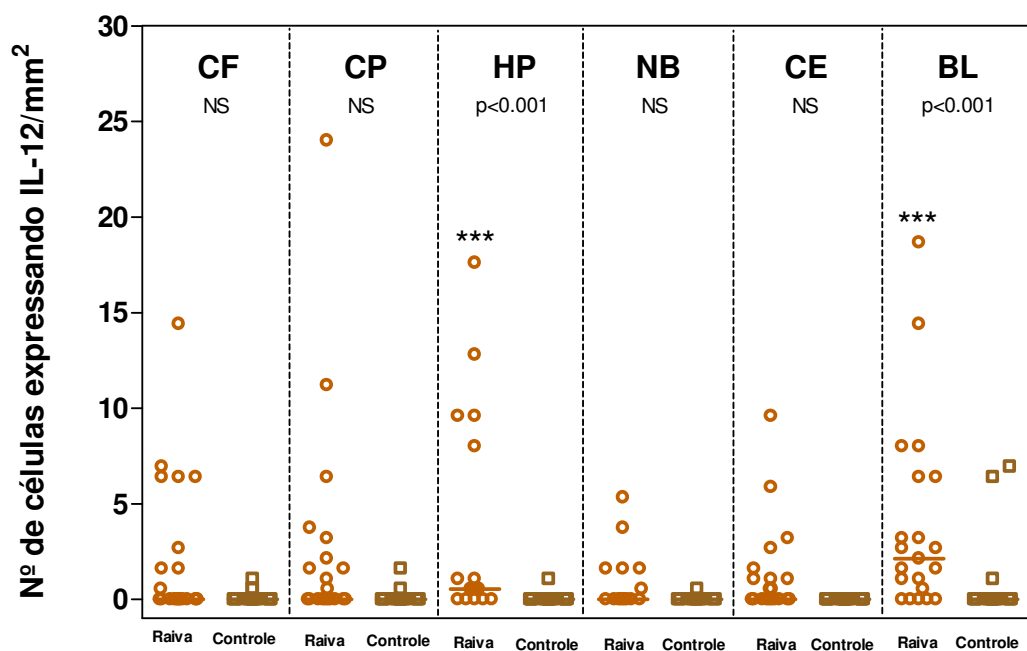


Gráfico 33 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando IL-12 por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.18 Células expressando granzima por microambiente e região do SNC

A avaliação das células expressando granzima constatou um aumento dessas células nos casos de raiva nos três microambientes analisados em comparação ao grupo controle (Figura 25, Gráfico 34).

Em relação às regiões do SNC observamos um aumento dessas células no grupo de raiva nos núcleos da base e no bulbo (Gráfico 35).

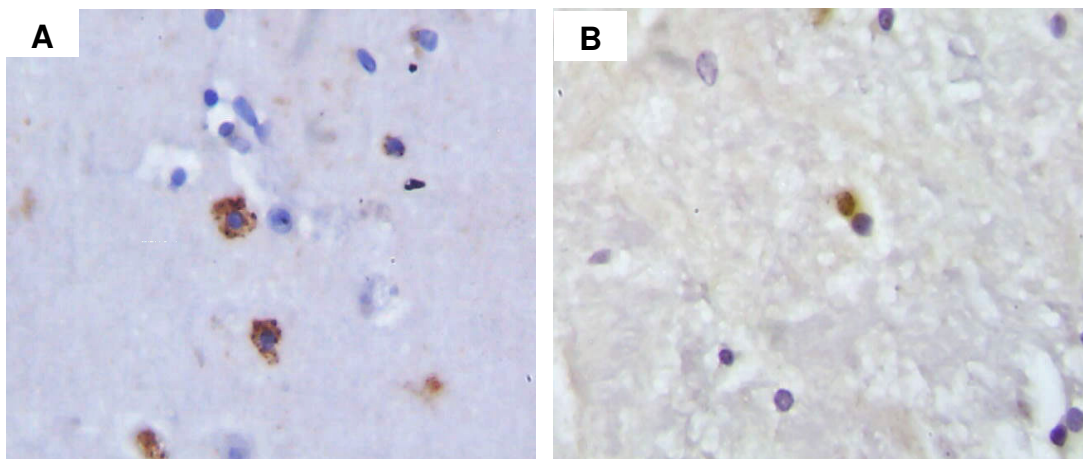


Figura 25. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando granzima. **A** - células imunomarcadas expressando granzima na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando granzima no grupo controle. Magnitude 400 x

Gráfico 34 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando granzima por mm^2 nos três microambientes do SNC. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

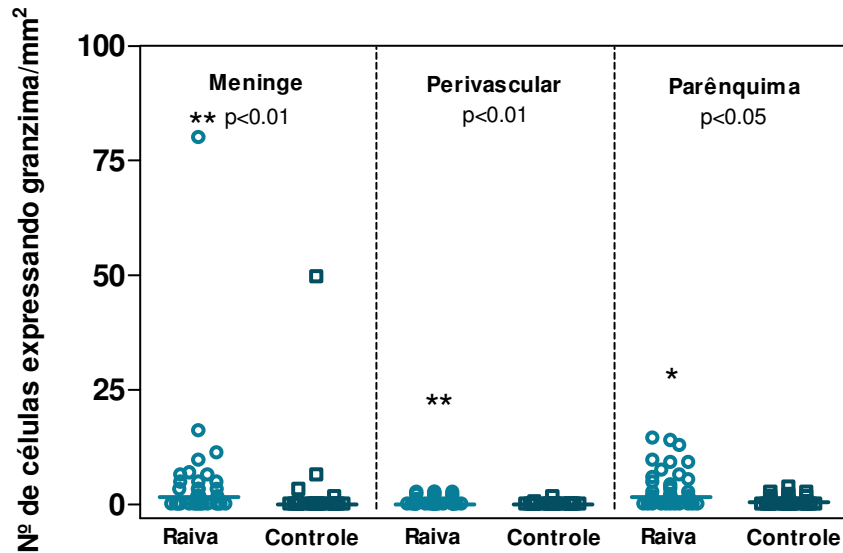
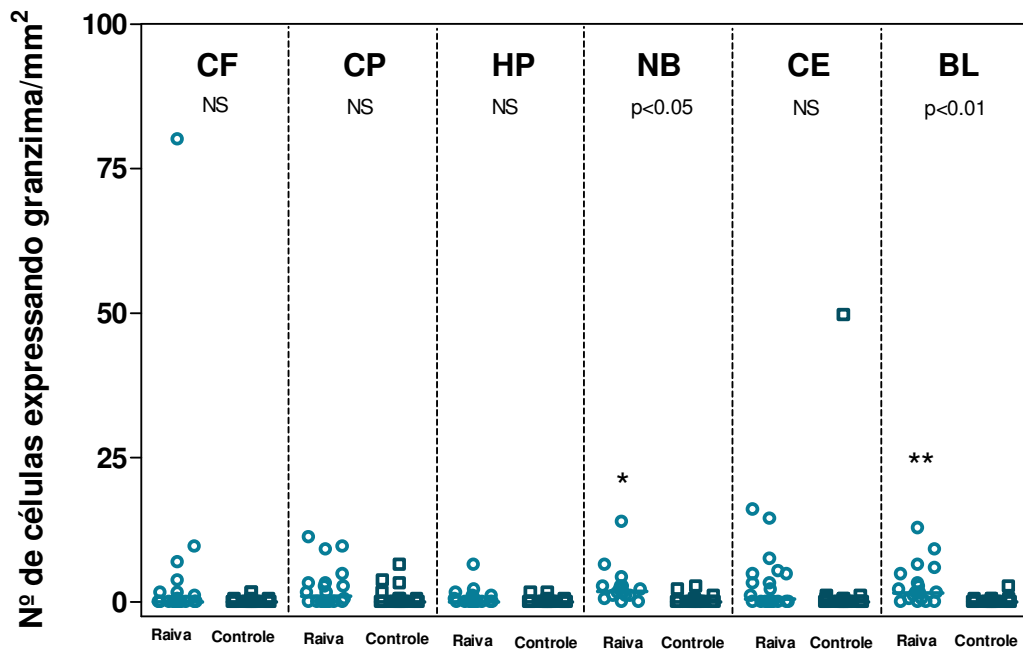


Gráfico 35 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando granzima por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.19 Células expressando iNOS por microambiente e região do SNC

A expressão de iNOS apresentou diferenças estatisticamente significantes no microambiente meningeal nos casos de raiva em comparação ao grupo controle (Figura 26, Gráfico 36).

Nenhuma diferença foi encontrada na expressão de iNOS no que se refere às regiões do SNC entre os dois grupos estudados (Gráfico 37).

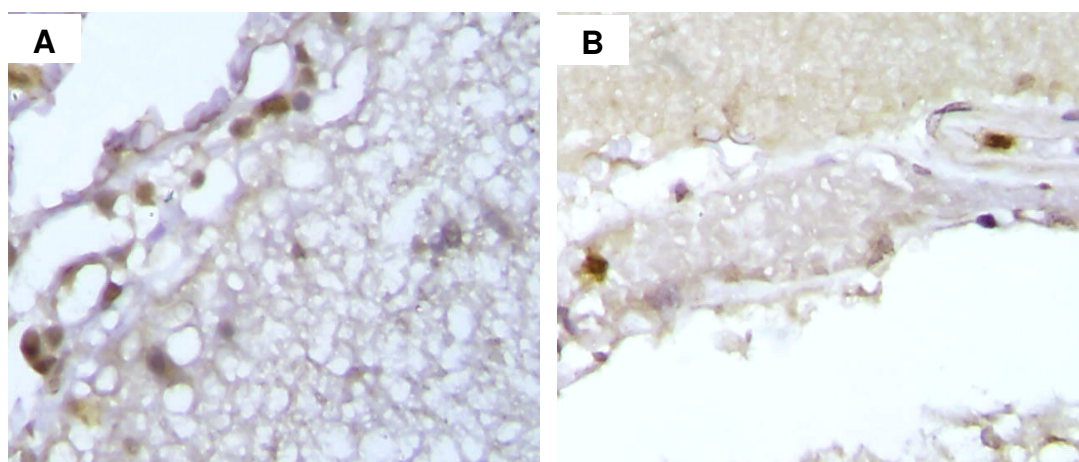


Figura 26. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células expressando iNOS. **A** - células imunomarcadas expressando iNOS na infecção rábica. **B** - células imunomarcadas expressando granzima no grupo controle. Magnitude 400x

Gráfico 36 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando iNOS por mm^2 nos três microambientes do SNC. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

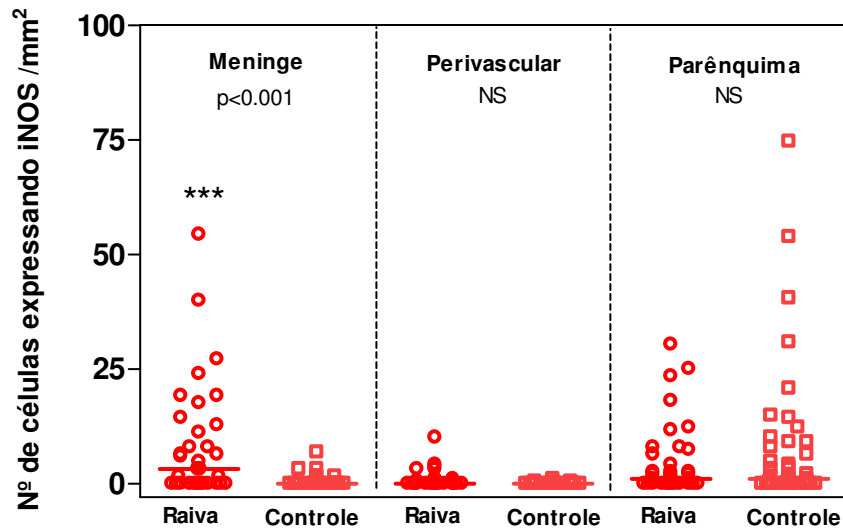
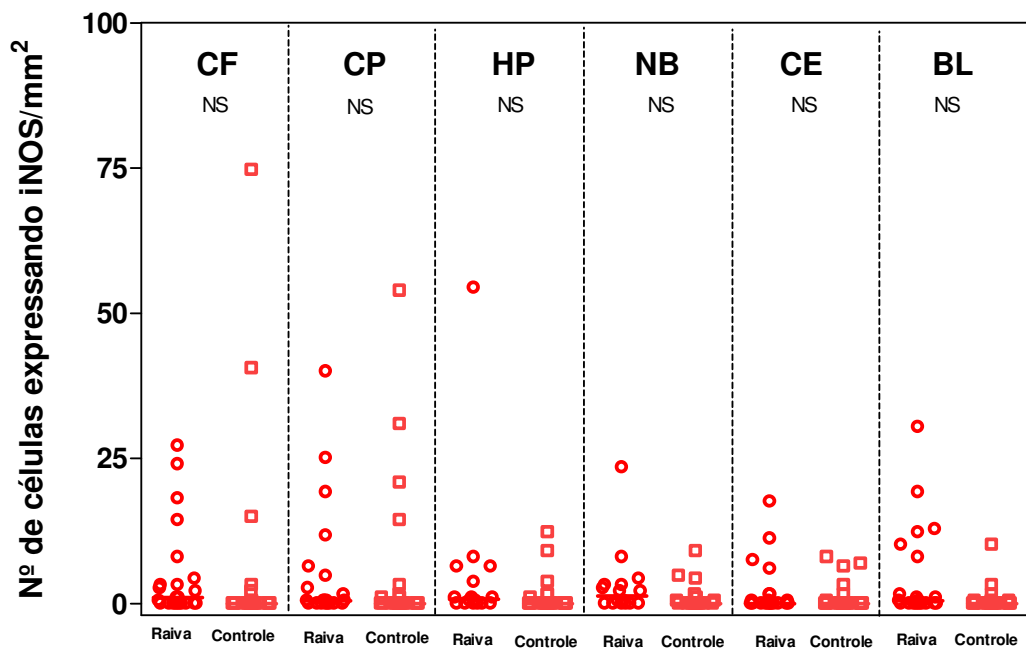


Gráfico 37 - Raiva e grupo controle: células imunomarcadas expressando iNOS por mm^2 nas diferentes regiões do SNC. **CF** - córtex frontal. **CP** - córtex parietal. **HP** - hipocampo e região para-hipocampal. **NB** - núcleos da base. **CE** - cerebelo. **BL** - bulbo. NS: não-significante. Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.20 Apoptose por microambiente e região do SNC

Em relação às células apoptóticas encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos no microambiente intraparenquimatoso, onde pudemos observar um maior número dessas células nos casos de raiva (Figura 27, Gráfico 38).

Não observamos diferenças estatisticamente significantes nas células apoptóticas entre os dois grupos estudados por região do SNC (Gráfico 39).

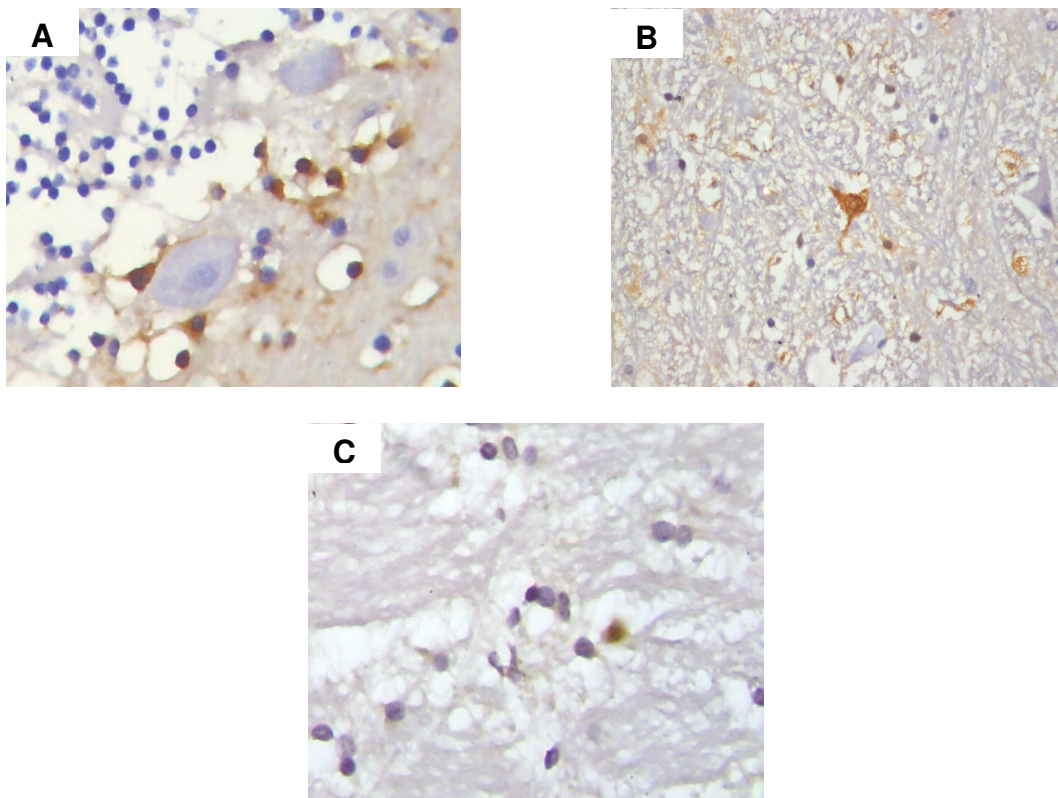
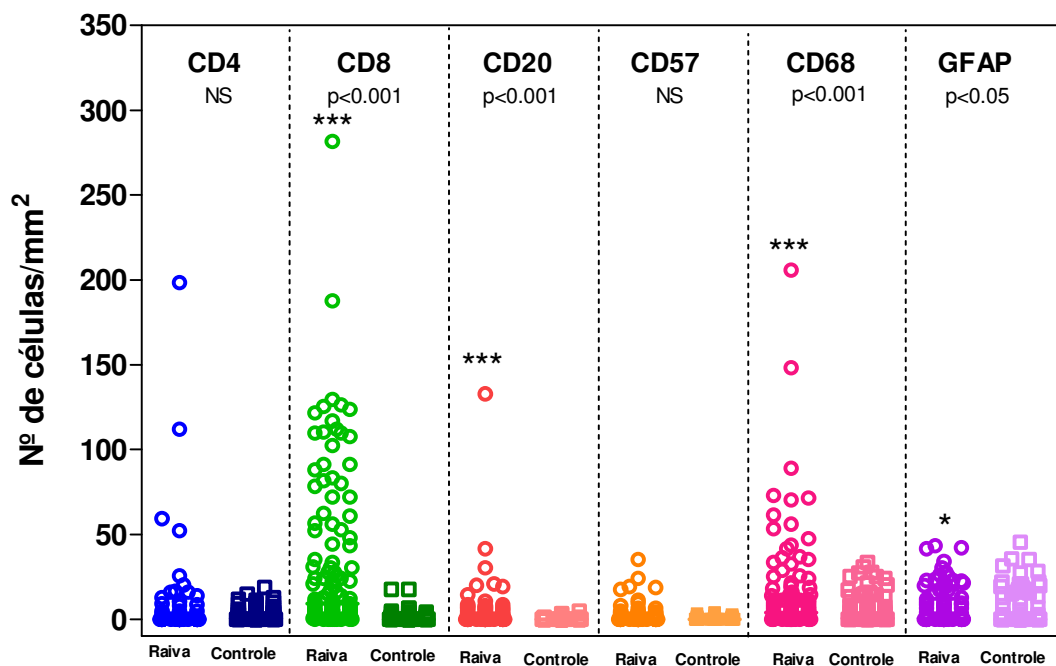


Figura 27. Raiva e controle: reação imuno-histoquímica para células apoptóticas. **A** células apoptóticas imunomarcadas na infecção rábica. Magnitude 400 x. **B** - neurônio apoptótico. Magnitude 200 x. **C** - célula apoptótica imunomarcada no grupo controle. Magnitude 400 x

5.3.21 Panorama geral do fenótipo das células na infecção rábica em comparação ao grupo controle

Foi verificado que na raiva houve aumento significativo da maioria das células inflamatórias pesquisadas em relação ao grupo controle, como pode ser visto no gráfico 41.

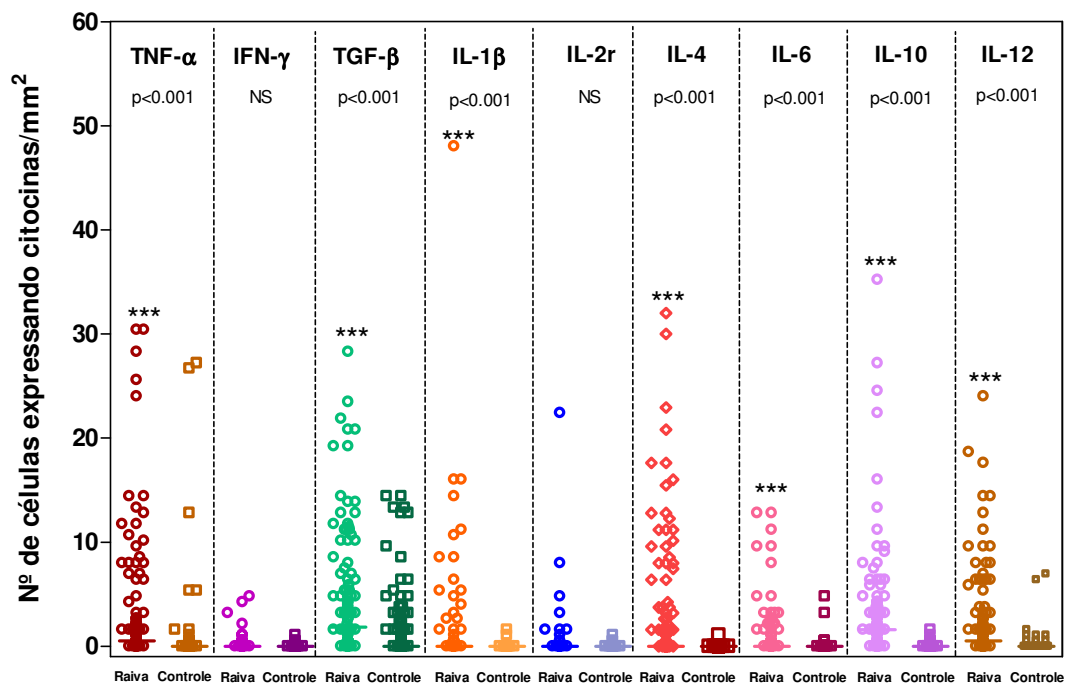
Gráfico 41 - Panorama do fenótipo celular na raiva e grupo controle no SNC.
Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.3.22 Panorama geral das citocinas na infecção rábica em comparação ao grupo controle

A maioria das citocinas pesquisadas, com exceção do IFN- γ e da IL-2r apresentou aumento significativo de sua expressão nos casos de raiva (Gráficos 42).

Gráfico 42 - Panorama das citocinas na raiva e grupo controle no SNC.
 Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn



5.4 Western-blot

A avaliação do anticorpo anti-raiva através da técnica de Western-blot confirmou a especificidade do mesmo, onde pudemos observar que as células RAW de camundongos (controle negativo) não apresentaram marcação para antígenos da raiva, diferentemente da região onde foram aplicados os vírus extraídos das vacinas anti-raiva (Figura 29).

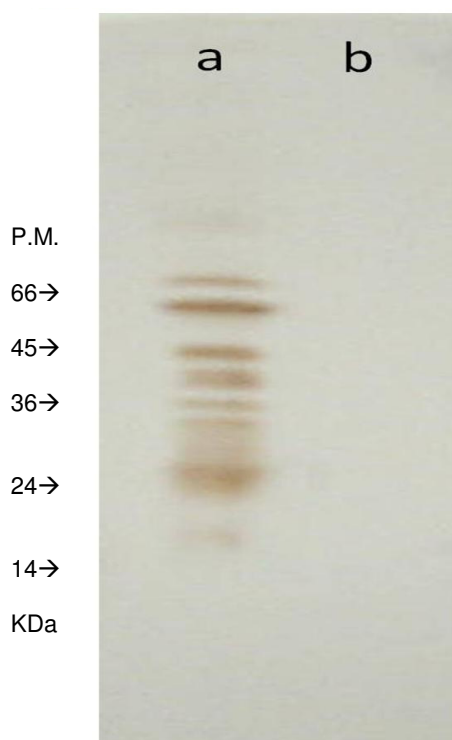


Figura 29. Reação de Western-blot. **A** - bandas marcadas na membrana de nitrocelulose específicas para raiva. **B** - células RAW de camundongos sem marcação para o vírus da raiva

5.5 RT-PCR para o vírus da raiva em material parafinado

Após inúmeras tentativas de extração de RNA viral de amostras de SNC com infecção rábica, nós não conseguimos obter uma RT-PCR positiva para o vírus rábico em material parafinado.

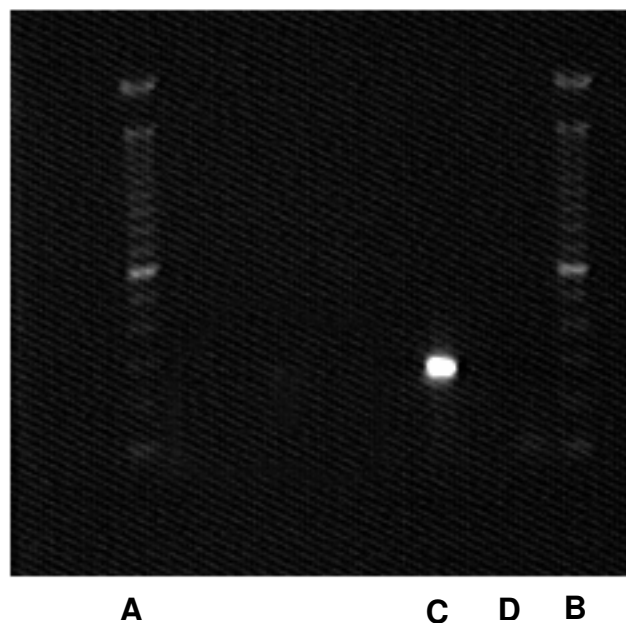


Figura 30. Reação de RT-PCR negativa para o vírus da raiva. **A** e **B** - pesos moleculares. **C** - CVS (controle positivo). **D** - água ultrapura (controle negativo)

DISCUSSÃO

7 - DISCUSSÃO

A raiva é uma doença fatal, ou melhor, quase invariavelmente fatal. Recente caso descrito na literatura demonstra a cura de uma paciente com infecção rábica sem que a mesma tivesse sido submetida à vacinação pós-exposição. Nessa paciente foi aplicado o tratamento descrito no protocolo denominado de “Milwaukee”, o qual emprega uma combinação de antivirais e indução ao coma (Willoughby et al., 2005). No Brasil, em Recife, no ano de 2008, tivemos conhecimento de um caso de raiva humana transmitida por morcego onde o paciente sobreviveu após utilização do protocolo “Milwaukee” (Brasil, 2009b).

A sobrevivência dos pacientes não vacinados, infelizmente ainda é uma exceção, se levarmos em conta que cerca de 60.000 pessoas morrem de raiva todo o ano, sendo a maioria delas crianças da Ásia e África (Belotto et al., 2005). Apesar da altíssima letalidade e da gravidade do quadro clínico, a raiva ainda é uma doença negligenciada, principalmente nos países em desenvolvimento (Fooks, 2005).

Estudos da resposta imune efetuados em animais experimentais enfatizam o papel da mesma na infecção rábica, destacando a sua influência no curso e nas manifestações clínicas da doença (Camelo et al., 2000; Lafon, 2005).

Diante do panorama ainda não esclarecido da raiva e das numerosas discussões e indagações a respeito dessa doença, nós nos propusemos

revisitar a histologia do SNC na raiva e caracterizar a resposta imune “in situ” do hospedeiro frente à infecção. Para tanto, elegemos verificar os eventos em três microambientes do SNC, a saber: microambiente meningeal, perivascular e intraparenquimatoso. Dessa maneira, os mesmos foram avaliados em relação ao fenótipo de células inflamatórias, células expressando citocinas e células produzindo radicais livres. Os mesmos parâmetros foram também avaliados de acordo com regiões do SNC (córtex frontal, córtex parietal, hipocampo e região para-hipocampal, núcleos da base, cerebelo e bulbo). Também foi realizado estudo da apoptose de neurônios e de outras células participantes da infecção rábica.

De acordo com o nosso conhecimento esse é o primeiro estudo em humanos que avalia de modo sistematizado a resposta imune “in situ” desencadeada pela raiva transmitida por morcegos, discriminando microambientes e regiões cerebrais.

O desequilíbrio ambiental influenciando o perfil epidemiológico da raiva

Nos dias atuais cada vez mais percebemos que a relação homem e meio ambiente nunca esteve tão interligada, pois com maior intensidade nos damos conta que intervenções ambientais impensadas e mal planejadas podem influenciar o comportamento habitual das relações entre as espécies animais em determinadas regiões e que tal desrespeito à natureza nos custa seguramente um alto preço.

Surtos de raiva ocorridos recentemente no Norte e Nordeste do Brasil (Gonçalves et al., 2002; da Rosa et al., 2006; Sato et al., 2006) preocuparam órgãos de saúde e causaram alarme em toda população.

Temos nos inquirido: por que ocorre um surto de raiva sem explicação aparente? Que fatores poderiam estar influenciando ou favorecendo a disseminação desse vírus em nosso meio? Fatores ambientais e/ou comportamentais poderiam contribuir para que isso acontecesse?

Os fatores ambientais e comportamentais podem sim influenciar no aparecimento de doenças tidas como controladas, permitindo a ocorrência de surtos. Sabemos que a modificação ambiental foi decisiva para a ocorrência dos surtos de raiva humana transmitida por morcegos ocorridos no Pará, nos anos de 2004 e 2005. Nas áreas onde ocorreram os surtos de raiva transmitida por morcegos os animais silvestres locais foram expulsos pelo homem devido à construção de moradias e introdução de criação de gado. O rebanho bovino passou então a fazer parte da cadeia alimentar dos morcegos. Quando o gado foi retirado do local, os morcegos começaram a se alimentar de sangue humano para garantir sua sobrevivência.

Os moradores das regiões afetadas pelo surto rábico no Pará vivem em condições precárias, em casebres em meio a clareiras e são alvos fáceis para morcegos vampiros famintos, que anteriormente se alimentavam de animais silvestres.

O pouco esclarecimento da população a respeito da infecção rábica dificultou o atendimento imediato às pessoas mordidas pelos morcegos, acarretando muitas mortes. Com a identificação do surto e esclarecimento

da população, medidas profiláticas foram tomadas e houve redução no número de casos de raiva na região.

Atualmente no Brasil a raiva urbana transmitida por cães e gatos, comum na década de 70 e 80, se encontra sob controle graças às campanhas de vacinação de animais domésticos. Assim sendo, os casos de raiva humana vêm decaindo a cada ano. Entre os anos de 1986 a 1999, tivemos cerca de 600 casos de raiva humana confirmados havendo queda progressiva até 2003 (74 casos), quando então ocorreram surtos nas regiões Norte e Nordeste em 2004 a 2006 (83 casos). No ano de 2007 foi confirmado apenas um caso de raiva humana e no ano de 2008 foram confirmados três casos de raiva humana (Brasil, 2009a).

Precisamos ter em mente que a situação da raiva em nosso país ainda merece particular atenção. Além dos surtos de raiva humana transmitida por morcegos vampiros, outra vertente do problema é a possibilidade da ocorrência de novos casos de raiva humana transmitida por canídeos silvestres já detectados como infectados no Norte e Nordeste do Brasil (Carnieli et al., 2006; Carnieli et al., 2008). Esses canídeos em virtude da devastação do ambiente pela ação do homem estão cada vez mais se aproximado das casas dos vilarejos, onde muitas vezes acabam tornando-se animais de estimação. Essa situação favorece o contato desses animais com homem e com outros animais domésticos, conseqüentemente aumentando o risco de contaminação.

A raiva humana transmitida por morcegos pode ser considerada uma meningoencefalomielite

A literatura que tivemos acesso não enfatiza o comprometimento meningeal na raiva.

Em nossa casuística, ao analisarmos os microambientes do SNC em relação à inflamação pudemos observar que a meninge esteve inflamada na maioria dos casos, apresentando quadro histopatológico de meningite.

Muito se discute a respeito do privilégio imune do SNC. Estudos revelam que na realidade esse privilégio imune se restringe ao parênquima e não às regiões como a meninge e o plexo coróide (Andersson et al., 1992; Blond et al., 2002).

Na infecção rábica humana transmitida por morcego, a meninge encontrou-se bastante comprometida no que se refere à infiltração por células inflamatórias e células expressando citocinas.

A partir da análise de nossa casuística podemos concluir que a raiva humana transmitida por morcego é uma infecção do SNC que envolve não só o microambiente intraparenquimatoso, como também o microambiente meningeal, podendo, portanto, ser caracterizada como uma meningoencefalomielite.

Corpúsculos de Negri, antígeno viral e não dissociação entre infecção e inflamação no microambiente parenquimatoso

Em nossa casuística encontramos corpúsculos de Negri esparsos em 75% dos casos de raiva, visualizados pela coloração de HE, apresentando uma maior freqüência no córtex parietal, bulbo e cerebelo. A maioria dos trabalhos sobre raiva demonstra, nas colorações pelo HE ou HE modificado, corpúsculos de Negri no cerebelo e hipocampo em 50% a 80% dos casos de raiva (Fekadu et al., 1988; Jogai et al., 2000).

Estudos em humanos empregando a técnica de imuno-histoquímica têm relatado a presença de antígeno viral em diferentes áreas do SNC, havendo descrições de positividade em córtex e tronco cerebral, além de cerebelo e hipocampo (Jogai et al., 2000; Jackson et al., 2001; Suja et al., 2004; Nuovo et al., 2005). De acordo com esses trabalhos a técnica de imuno-histoquímica seria considerada mais eficaz para detecção de infecção viral do que a coloração histológica de HE.

Devemos ressaltar que através de reação imuno-histoquímica e utilizando metodologia quantitativa verificamos distribuição mais ampla e difusa do antígeno viral no SNC, em todas as regiões pesquisadas. Não havendo diferenças estatísticas entre a concentração de antígenos nas diferentes regiões do SNC.

A constatação de distribuição ampla e difusa do antígeno viral no SNC é um dado de aplicação prática importante porque permite o uso da técnica

imuno-histoquímica para o diagnóstico de raiva, sem se ter a necessidade de selecionar regiões específicas para o encontro do antígeno da raiva.

Assis e Rosemberg (1984) encontraram na raiva humana transmitida por cão uma dissociação entre a presença de corpúsculos de Negri nos neurônios e inflamação parenquimatosa, quando analisaram as diferentes regiões do SNC. Em nossa casuística nós não constatamos essa dissociação. Por exemplo, verificamos que o bulbo, uma das áreas mais afetadas pela inflamação, também foi bastante acometido apresentando corpúsculos de Negri e expressiva quantidade de antígeno viral. Nossos achados estão, portanto, em concordância com o trabalho de Jogai et al. (2000), que demonstraram uma correlação positiva entre inflamação e intensidade da imunopositividade para o antígeno viral.

Como as células endoteliais e os astrócitos contribuiriam para a patogenia da raiva – uma via alternativa de disseminação viral

Estudos imuno-histoquímicos para detecção do antígeno do vírus da raiva têm demonstrado que não somente os neurônios, mais também outras células como, microglia, astrócitos e células endoteliais estão imunomarcados com antígenos da raiva (Ray et al., 1997; Fekadu et al., 1988; Suja et al., 2004).

Essa constatação levantou várias hipóteses para esclarecer qual seria o real papel desempenhado por essas células, que não os neurônios, na patogenia da raiva. Permanece ainda uma incógnita se o vírus da raiva

estaria infectando células microgliais e astrócitos (que serviriam como células apresentadoras de antígenos ou como reservatórios do vírus) ou se as mesmas estariam fagocitando os “debris” de neurônios infectados (Ray et al., 1997; Aloisi et al., 1998; Jogai et al., 2000).

Estudos têm sugerido que as células microgliais e os astrócitos suportam a replicação viral, contribuindo para disseminação ou persistência do vírus rábico (Matsumoto, 1963; Smith et al., 1991). Essas células gliais também estariam envolvidas na patogênese da raiva, afetando a saúde fisiológica dos neurônios, via liberação de citocinas ou neurotoxinas (Ray et al., 1997).

Nuovo et al. (2005), constaram através de reação imuno-histoquímica de dupla marcação (anticorpos anti-vírus rábico e anti-GFAP), que os astrócitos demonstravam em seu citoplasma antígenos para o vírus da raiva e que então, essas células poderiam ser infectadas pelo vírus rábico, contudo, em menor número que os neurônios.

Um dos aspectos relevantes de nossa investigação foi a demonstração de células endoteliais vasculares expressando antígeno do vírus da raiva. A especificidade de imunomarcação para o vírus da raiva nas células endoteliais foi comprovada através da reação imuno-histoquímica de dupla-marcação para células endoteliais com o emprego do anticorpo anti-CD34 e o anticorpo anti-raiva.

Gostaríamos de enfatizar que em nossa casuística identificamos antígenos virais em células mononucleadas, presentes na luz de vasos

parenquimatosos e também nas células do infiltrado inflamatório perivascular, além de neurônios.

Outro aspecto que julgamos muito relevante em nossa pesquisa foi a intensidade e a ampla distribuição de imunomarcação para o vírus da raiva em astrócitos. Através de reação imuno-histoquímica de dupla-marcação com o anticorpo anti-GFAP e o anticorpo anti-raiva, observamos que os astrócitos demonstraram grande quantidade de antígeno viral no corpo citoplasmático e também nos seus prolongamentos, muitos dos quais estiveram em contato com os neurônios adjacentes, quando suas membranas mostraram-se justapostas. Nos astrócitos ainda pudemos comprovar freqüentes inclusões como morfologia e dimensões superponíveis aos corpúsculos de Negri que visualizamos na coloração pela HE.

Poderíamos imaginar que esses astrócitos demonstrando antígenos da raiva estariam funcionando como APCs. Já foi demonstrado que os astrócitos não desempenham bem essa função, pois, para tanto, essas células necessitariam de ativação, incluindo indução de MHC I e II pelo IFN- γ , para que pudessem apresentar o antígeno para linfócitos TCD8 e TCD4, respectivamente (Fierz et al., 1985; Fontana et al., 1986; Constantinescu et al., 2005). Em nossa casuística nós observamos quantidades baixíssimas de IFN- γ , o que não favoreceria a ativação dos astrócitos de modo a cumprir a função APC. Por outro lado, a presença de grande quantidade de antígenos virais encontrados nessas células poderia estar provavelmente relacionada à real infecção das mesmas.

Sabe-se que a rota de infecção rábica que se faz por transporte axonal retrógrado através dos nervos periféricos tem ampla aceitação (Tsiang, 1979; Kucera et al., 1985; Gillet et al., 1986; Tsiang et al., 1991). Contudo, outras vias alternativas de infecção neuronal ainda não são aceitas. Não está bem estabelecido se o vírus da raiva está presente no sangue durante a infecção, apesar de alguns estudos sugerirem contaminação através do sangue de animais infectados (Sitprija et al., 2003) e de ter sido demonstrado experimentalmente RNA viral no sangue de camundongos doentes, sugerindo a ocorrência de viremia na raiva (Lodmell et al., 2006).

Acreditamos que seria plausível que existam outros padrões de infecção neuronal que não envolvam a junção neuromuscular. As células endoteliais e os astrócitos poderiam ser vias para a infecção neuronal. O fato de ser a mordida de morcego muitas vezes quase imperceptível (Jackson e Fenton, 2001), com um envolvimento muscular mínimo, aliado a identificação de antígenos virais nas células endoteliais e a intensa expressão antigênica do vírus da raiva em astrócitos nos autoriza a propor uma via alternativa para a progressão do vírus da raiva até os neurônios. Sendo assim, a nossa hipótese é que após a mordida do morcego raivoso o vírus penetraria na pele e que a sua entrada nas células endoteliais poderia ser mediada por pinocitose, por receptores desconhecidos ou mesmo pelo TLR3 (Tissari et al., 2005). O vírus alcançaria o SNC por via hematogênica, quebraria a BBB, infectaria os astrócitos e através dos mesmos atingiria e infectaria os neurônios.

Apesar dessa hipótese alternativa para a chegada do vírus ao SNC nos casos de raiva transmitida pelo morcego, os dados disponíveis até o presente momento não permitem descartar a rota de infecção por via axonal retrógrada, que poderia ocorrer de modo concomitante com a via hematogênica.

Novas investigações deverão ser feitas no sentido de melhor esclarecer a complexa patogenia do processo de infecção e a rota seguida pelo vírus da raiva até atingir os neurônios centrais.

O período de incubação mais prolongado que se observa na raiva transmitida por morcegos poderia eventualmente estar relacionado a uma permanência mais demorada do vírus nos astrócitos. Ao utilizarmos a técnica de dupla marcação (astrócitos e caspase 3) praticamente não detectamos apoptose de astrócitos o que favoreceria a permanência do vírus nessas células, uma vez que as mesmas são protegidas da morte celular programada em virtude de não possuírem receptor de morte (Farina et al., 2007).

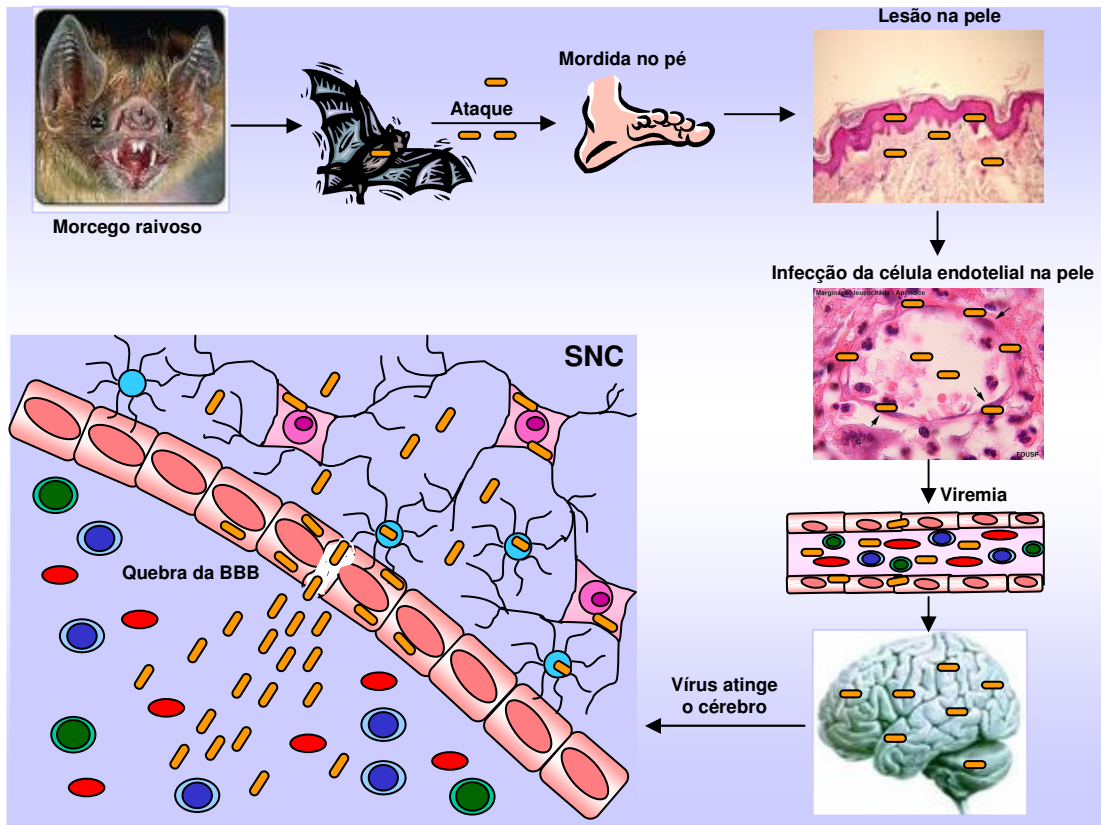
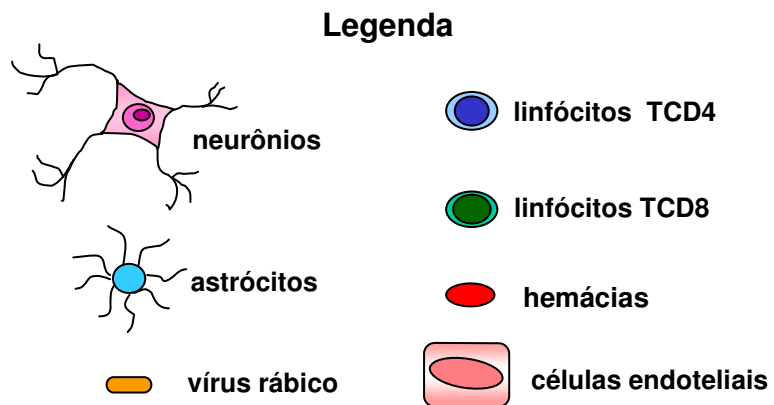


Figura 31. Via hematogênica alternativa de disseminação neuronal pelo vírus da raiva.



Qual o perfil de resposta imune “in situ” no SNC na raiva humana?

Em modelos experimentais (Mifune et al., 1981; Smith, 1981; Perry e Lodmell, 1991; Lafon, 2005) a resposta imune frente à infecção rábica envolve um infiltrado inflamatório de células mononucleares, composto principalmente por linfócitos. Esses linfócitos migram da periferia para o SNC, atraídos pelo estímulo de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Os dados disponíveis caracterizam em modelos experimentais um perfil citocínico predominantemente pró-inflamatório com baixa expressão de IFN- γ (Marquette et al., 1996; Camelo et al., 2000).

Em humanos, Nuovo et al. (2005) demonstraram expressão de TNF e iNOS no SNC em casos de raiva.

Com o nosso estudo pudemos caracterizar “in situ” no SNC, um perfil pró-inflamatório (expressão local de TNF α , IL-1 β e IL-6) aliado a um perfil do tipo Th2 e baixa expressão de IFN- γ . Esses perfis foram acompanhados de infiltrado inflamatório composto de células mononucleares, com predomínio de linfócitos TCD8 sobre os linfócitos TCD4, presença de linfócitos B nos três microambientes estudados.

Julgamos que a caracterização do fenótipo e das citocinas expressas “in situ” nas lesões do SNC na raiva humana contribui para o melhor entendimento dos mecanismos patogênicos envolvidos na doença e é de utilidade para a decisão de terapêuticas a serem propostas no cuidado dos pacientes acometidos por essa grave enfermidade.

A resposta imune inata na infecção rábica humana

Em resposta à infecção pelo vírus da raiva constatamos aumento dos macrófagos CD68+ em relação aos casos controles. O aumento revelou significação estatística no microambiente meningeal. Essas células podem exercer sua função de fagocitose do vírus, participar dos nódulos microgliais com a finalidade de eliminar os “debris” de neurônios mortos pela infecção ou desempenhar função de APCs. Ray et al. (1995) sugerem a partir de estudos em camundongos que o vírus rábico pode infectar, se replicar e persistir em macrófagos, que serviriam assim como reservatórios para o vírus da raiva. Nós encontramos em nossa casuística células mononucleares imunomarcadas com o antígeno da raiva na luz de vasos.

Além de macrófagos fazendo parte da resposta imune inata, observamos também em nosso estudo um pequeno aumento das células NK nos casos de raiva apenas no microambiente meningeal, não estando aumentadas no ambiente parenquimatoso e perivascular, dados que acreditamos ter interferência decisiva no curso grave da infecção rábica.

Atualmente, as células NK são sedes de intensas investigações em relação às suas reais funções e ao seu comportamento decisivo frente às situações que ameaçam o microambiente. As células NK não são simplesmente células matadoras através de sua atividade citotóxica, mas, também exercem múltiplas outras funções, como a de produção de citocinas, quimiocinas e de recrutamento e ativação de outras células hematopoiéticas. São tidas como orientadoras da resposta inflamatória,

sendo células efetoras da imunidade inata e ainda podem modificar o curso da resposta imune adquirida (Di Santo, 2008).

Alguns raros estudos em humanos e em animais experimentais apontam para o papel protetor da NK na raiva (Panpanich et al., 1992; Megid and Kaneno, 2000). Uma das maneiras que o vírus rábico encontraria para subverter a ação protetora da NK seria causar apoptose dessas células, como já sugerido por alguns estudos experimentais (Thoulouze et al. 1997; Baloul e Lafon, 2003).

Considerando os fatos acima destacados podemos inferir que a resposta inexpressiva de células NK no parênquima cerebral nos casos de encefalite rábica poderia representar o resultado da interferência direta do vírus nos receptores de ativação e inibição dessas células, fazendo com que as mesmas perdessem sua atividade citotóxica. Outra hipótese seria que sua diminuição resultasse de apoptose das células NK induzida pelo vírus, “desautorizando” a sua permanência no microambiente para cumprir seu papel efetivo no clareamento viral. Nós não conseguimos detectar através de reação imuno-histoquímica de dupla marcação apoptose significativa de células NK.

Cientes da importância do papel das células NK na resposta imune inata e adquirida, esperamos que essas células possam no futuro serem utilizadas na prática clínica fazendo parte de protocolos terapêuticos de pacientes acometidos pela raiva.

Para que haja uma ponte entre a resposta imune inata e o desenvolvimento da resposta imune adquirida, a IL-12 é uma citocina de

fundamental importância. Produzida principalmente por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, essa citocina tem papel fundamental no estímulo e ativação de linfócitos TCD4+, TCD8+ e células NK, induzindo essas células a produzirem IFN- γ (Abbas et al., 2003).

Em nossa casuística as células expressando IL-12 estiveram em número aumentado nos casos de raiva nos microambientes meningeal e intraparenquimatoso. Em relação às regiões do SNC pudemos observar um aumento das células expressando IL-12 nos casos de raiva no hipocampo e no bulbo, quando comparados ao grupo controle. A verificação desse comportamento da IL-12 poderia ter respaldo na interpretação de que os pacientes acometidos pela raiva são imunocompetentes de base. Os achados de falta de resposta das células NK à infecção rábica e o comprometimento da resposta imune adaptativa seqüencial seria consequência direta da ação viral sobre as células NK, refletindo assim a manipulação do vírus sobre a resposta imune do hospedeiro, impedindo fundamentalmente a produção de IFN- γ .

Em suma, na raiva, através da avaliação dos eventos que ocorrem localmente no SNC, caracterizamos uma falta de resposta das células NK frente à agressão viral, provavelmente por interferência direta do vírus com os receptores de ativação ou de inibição das células NK.

Papel das citocinas pró-inflamatórias no SNC na raiva e a produção de NO

Mecanismos de neurotoxicidade e neuroproteção estão intimamente relacionados com o balanço entre citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias. Sabe-se que o papel das citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF na neurotoxicidade é considerável, mas controverso.

Quando analisamos as células expressando IL-1 β por microambiente no SNC verificamos aumento dessas células nos casos de raiva na meninge e no ambiente intraparenquimatoso, porém, não encontramos diferenças em relação às regiões do SNC. A IL-1 por si só não é tóxica no cérebro saudável, mas, pode em concentrações um pouco aumentadas na vigência de processos inflamatórios causar injúria aos neurônios (Dinarello, 1996; Allan e Rothwell, 2001).

Já foi demonstrada em estudos experimentais a presença de IL-6 no SNC nos casos de raiva (Marquette et al., 1996; Camelo et al., 2000). Em nossa casuística células expressando IL-6 mostraram-se aumentadas nos casos de raiva nos microambientes meningeal e intraparenquimatoso. Foi observado aumento da expressão dessa citocina no hipocampo nos casos de raiva.

Outra citocina pró-inflamatória de relevância é o TNF, uma citocina multipotencial, que atua na ativação, recrutamento, diferenciação de células e em mecanismos de apoptose. É bem conhecido que a produção inapropriada ou excessiva dessa citocina pode ser prejudicial, causando

efeitos deletérios para os tecidos e células que os compõem (Sedgwick et al., 2000; Bradley, 2008). Na raiva humana transmitida por morcegos observamos aumento da expressão de TNF- α nos casos de raiva nos três microambientes quando comparados ao grupo controle, sendo o hipocampo e o bulbo as regiões com maior predomínio dessas citocinas.

Julgamos que esse aumento de TNF- α poderia estar favorecendo a necrose neuronal, e assim sendo desempenhando um efeito mais deletério do que protetor na infecção rábica. As citocinas IL-1 e IL-6 devem também contribuir como adjuvantes para a injúria neuronal.

Em humanos, Nuovo et al. (2005), demonstram através de estudo imuno-histoquímico em material parafinado de SNC, que a encefalite rábica é uma infecção maciça de neurônios, com concomitante alta expressão de TNF- α e iNOS em células vizinhas não infectadas. Essa alta expressão de TNF- α e iNOS poderia levar ao dano neuronal e prejuízo ao tecido de suporte dos mesmos. Outros estudos também relatam o papel prejudicial do iNOS na infecção rábica (Ubol et al., 2001; Shin et al., 2004).

Nós verificamos aumento da expressão de iNOS nos casos de raiva no microambiente meningeal. O óxido nítrico é um radical gasoso produzido por diferentes tipos celulares e que medeia uma variedade de funções, incluindo vasodilatação, neurotransmissão e citotoxicidade imune. O aumento do NO produzido na tentativa de conter a infecção, a exemplo das citocinas pró-inflamatórias, pode causar efeito deletério em neurônios.

Olhando para os nossos resultados e correlacionando-os com os informes da literatura, podemos concluir que as citocinas pró-inflamatórias e

a produção local de NO no SNC devem favorecer o dano neuronal em casos de raiva humana.

Participação dos linfócitos B na infecção rábica no SNC

Estudos em modelos experimentais demonstram o papel protetor dos linfócitos B como fonte de anticorpos neutralizantes para o vírus rábico (Miller et al., 1978; Dietzschold et al., 1992; Hooper et al., 1998). A glicoproteína (G) do vírus da raiva é a principal responsável pela indução de anticorpos neutralizantes para o vírus (Dietzchold et al., 1983). Templeton et al. (1986), demonstram que camundongos com altas concentrações de anticorpos são mais resistentes à infecção quando desafiados com o vírus rábico, enquanto que aqueles com baixas quantidades de anticorpos são suscetíveis à infecção.

É importante ressaltar que a BBB íntegra é impermeável para a maioria dos anticorpos. Uma vez que ocorra a quebra da BBB, os anticorpos neutralizantes poderiam exercer seu papel protetor nos locais de proliferação viral contribuindo para eliminação do vírus rábico do SNC.

No SNC de indivíduos humanos observamos aumento dos linfócitos B na infecção rábica nos três microambientes, contudo, essas células não se encontravam em grande quantidade, apesar da acentuada expressão de antígenos virais. Essa situação poderia refletir o grau de comprometimento na produção de anticorpos específicos para o vírus rábico.

Por outro lado, provavelmente o pequeno comparecimento de linfócitos B nas lesões poderia em parte resultar da diminuição da ativação dos mesmos, em decorrência da depleção local de linfócitos TCD4+ o que comprometeria a cooperação imune entre essas células.

É sabido que uma vez que o vírus rábico atinge o SNC, o “clareamento” da infecção requer a invasão local por células imunes, principalmente linfócitos TCD4+ e linfócitos B (Phares et al., 2006; Roy e Hooper, 2008) e que na ausência integrada desses fatores imunes a raiva é letal (Roy et al., 2007).

Papel dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ na infecção rábica e baixa expressão de citocinas de padrão Th1

Em nossa casuística demonstramos que na raiva humana transmitida por morcego os linfócitos TCD4+ comparecem em pequena quantidade no SNC. De acordo com Lafon (2005), a proteção contra encefalite rábica é conferida pelos linfócitos TCD4+, pois em estudo experimental a encefalopatia fatal só se desenvolveu em camundongos após a depleção de linfócitos TCD4+ e não de linfócitos TCD8+. Assim sendo, os resultados obtidos a partir da quantificação das células TCD4+ em humanos corroboram aqueles verificados em animais experimentais que destacam o papel crucial desses linfócitos em conferir proteção.

Outros estudos experimentais sugerem que os linfócitos citotóxicos sozinhos não são suficientes para conferir proteção contra infecção rábica (Wiktor et al., 1984; Celis, 1990).

Em nosso estudo, os linfócitos TCD8⁺ estavam aumentados em relação ao grupo controle em todos microambientes do SNC nas diversas regiões cerebrais, com exceção do cerebelo. Esse fato nos levou a investigar o papel citotóxico dos linfócitos TCD8⁺ na raiva, avaliando assim a sua função efetora, para tanto, nos detivemos à pesquisa de células expressando granzima. Não obtivemos, contudo, uma correlação positiva entre a quantidade de linfócitos TCD8⁺ e a expressão de granzima ($r=0.0023$), sugerindo que a atividade citotóxica dos linfócitos TCD8⁺ poderia estar prejudicada na infecção rábica transmitida por morcego.

De posse desses dados pudemos concluir que à semelhança de estudos em modelo experimental, na raiva humana transmitida por morcegos há diminuição de linfócitos TCD4⁺, aumento de linfócitos TCD8⁺ e que esses últimos estariam com sua atividade citotóxica prejudicada.

Outra questão que investigamos foi a correlação de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e a produção de citocinas de perfil Th1. Os linfócitos TCD4 e TCD8, assim como as células NK, são as principais células produtoras de IFN, uma citocina definidora da resposta Th1 e que tem papel essencial no combate a infecções virais (Guidotti e Chisari, 2001). A ação antiviral do IFN deve-se a inibição da replicação dos vírus, a ativação de macrófagos e ao aumento da expressão de moléculas relacionadas ao MHC de classe I, que media a ação dos linfócitos T citotóxicos (Farr e Schreiber, 1993). Em nossa casuística

encontramos quantidades ínfimas de IFN- γ nos casos de raiva, o que ocorreu em concomitância com as baixas quantidades de linfócitos TCD4+ e células NK encontradas no SNC.

Embora na raiva humana transmitida por morcego nós tenhamos encontrado grandes quantidades de linfócitos TCD8+, provavelmente eles não estariam contribuindo para uma maior produção de IFN- γ . A baixa expressão de IFN- γ poderia estar também associada a um mecanismo de escape do vírus rábico. Dados da literatura demonstram que o vírus rábico tem a habilidade de interromper a produção de IFN- γ estimulado pela via de sinalização JAK-STAT e conseqüentemente prevenir os efeitos antivirais dessa citocina. O mecanismo pelo qual o vírus rábico interrompe essa sinalização envolve uma associação específica da proteína P viral com STAT1 e STAT2 exclusivamente após ativação pelo IFN, diminuindo a sua produção e prejudicando o padrão de resposta imune Th1 (Brzózka et al., 2006; Chelbi-Alix et al., 2006).

Outro achado que nos chamou a atenção foi a baixa expressão de IL-2r nos casos de raiva humana transmitida por morcego. A IL-2r é principal citocina responsável pela ativação de linfócitos (Roitt et al., 1998) e sua baixa expressão poderia indicar ativação prejudicada dessas células. Esse achado, aliado à baixa expressão de granzima, a expressão ínfima de IFN- γ e a diminuição de células TCD4, provavelmente reflete ativação prejudicada dessas células imunes.

Em resumo, na raiva humana transmitida por morcego temos além da diminuição de linfócitos TCD4+, uma grande quantidade de linfócitos TCD8+,

mas que não apresentam atividade citotóxica efetora, quer por meio da expressão de granzima, quer pela produção de IFN- γ .

A raiva humana transmitida por morcegos é uma infecção de padrão Th2

Existem muitas especulações sobre o papel da resposta imune na infecção rábica. Estudos experimentais demonstram sua importância no desfecho fatal ou na sobrevivência dos animais estudados (Mifune et al., 1981; Smith, 1981; Perry e Lodmell, 1991; Lafon, 2005).

O grande problema quando se pensa em resposta imune no cérebro é a BBB, uma vez que se tem o conceito de que o cérebro é um órgão imunoprivilegiado. Mas até que ponto vai esse privilégio imunológico?

Em nosso estudo constatamos que células imunes como linfócitos atravessam a BBB na tentativa de combater a infecção e que existe a produção de citocinas pró-inflamatórias localmente no SNC como IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Entretanto, nos chamou a atenção nos casos de raiva o encontro de alta expressão de IL-4 nos três microambientes do SNC. A IL-4 é uma citocina pleiotrópica capaz de influenciar a diferenciação de células T, sendo a sua expressão responsável pela polarização para uma resposta imune tipo Th2. Essa citocina estimula a ativação e recrutamento dos mastócitos e a produção de anticorpos IgE através da diferenciação de células B. Além disso, a IL-4 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, a atividade

citotóxica dos macrófagos e conseqüentemente a produção de NO (Abbas, 2003).

A expressão aumentada de IL-4 favoreceria um padrão Th2 de resposta imune, prejudicando assim o efeito antiviral que uma resposta de perfil Th1 poderia ocasionar. Na nossa casuística verificamos resposta pouco expressiva de NK e depleção de linfócitos TCD4+, uma população celular crucial para o direcionamento do perfil imune. Levando em consideração esses achados nos perguntamos que outras células poderiam estar produzindo essa quantidade expressiva de IL-4?

Dados da literatura demonstram que no SNC normal a IL-4 não é detectável, mas as células microgliais e os astrócitos podem produzir IL-4 após a sua ativação durante processo de inflamação (Hulshof et al., 2002; Ponomarev et al., 2007). Na raiva humana transmitida por morcego os astrócitos poderiam estar produzindo IL-4, contribuindo para o direcionando a resposta imune para um perfil Th2.

A IL-10 é uma citocina que inibe a produção de IFN- γ , além de inibir a apresentação de antígeno e a produção de IL-1, IL-6 e TNF- α , favorecendo juntamente com a IL-4 uma resposta padrão Th2 e ativação de linfócitos B (Roitt et al., 1998). Em nossa casuística constatamos aumento de células expressando IL-10 nos casos de raiva nos três microambientes, assim como nas diferentes regiões do SNC, com exceção do cerebelo.

Em síntese, os nossos resultados nos permitiram concluir que na raiva humana transmitida por morcego ocorre acentuada expressão local no SNC de IL-4 e IL-10 o que caracterizaria um padrão de resposta Th2.

O vírus rábico induz maior expressão de TGF- β no SNC de pacientes raivosos

Todo processo inflamatório uma vez iniciado necessita ser contido para que não haja uma exacerbação da resposta imune no hospedeiro. O TGF- β é a principal citocina responsável por essa imunoregulação, pois classicamente tem efeito inibitório sobre a proliferação, diferenciação e ativação de linfócitos (Letterio e Roberts, 1998).

Nos casos de raiva humana transmitida por morcegos as células expressando TGF- β estiveram aumentadas nos microambientes meningeal e perivascular, quando comparadas ao grupo controle. Entretanto, em relação às regiões do SNC não houve qualquer diferença entre os dois grupos.

Sendo o SNC um local imuneprivilegiado, e considerando-se que qualquer dano neuronal pode ser irreversível, é esperado o encontro habitual de TGF- β no cérebro normal (Krieglstein et al., 2002). Em nossa pesquisa essa citocina esteve aumentada nos casos de raiva, quando comparados com os casos controles. Isso poderia acontecer em decorrência dos mecanismos de escape do vírus rábico que desfavorecem um perfil citocínico Th1 e favorecem os perfis Th2 e Th3. A importante expressão de TGF- β poderia ser mais uma tentativa desesperada do cérebro em manter sua rede neuronal intacta, freando a resposta imune exacerbada.

O hospedeiro, na tentativa de lidar com uma resposta inflamatória que poderia ser lesiva, é capaz de lançar mão de mecanismos de controle antiinflamatórios, através da produção de TGF- β por outras células, por

exemplo, os astrócitos. Os astrócitos são células importantíssimas no SNC, tendo papel fundamental na sustentação, no desenvolvimento e nas interações neuronais. Essas células têm sido descritas como decisivas no controle do tônus vascular, na neurogênese e na sinaptogênese (Kreft et al., 2009). Além dessas funções, os astrócitos também são capazes de produzir TGF- β e desta forma, proteger o SNC de qualquer dano que possa ocorrer diante de uma resposta imune exacerbada (Aloisi et al., 2000).

Nós detectamos através de reação imuno-histoquímica de dupla marcação que os astrócitos estavam infectados pelo vírus rábico. A infecção viral dessas células poderia levá-las a produzir TGF- β em níveis mais elevados que o encontrado no SNC normal e assim diminuindo o risco de destruição neuronal.

Apoptose na raiva humana e seu papel na patogênese da doença

A apoptose tem papel biológico no desenvolvimento, na homeostase de populações celulares e também na patogênese de muitas doenças. A ativação das caspases, uma família de proteases de cisteína, é um importante evento para o desencadeamento do processo apoptótico (Schmitz et al., 2000).

Estudos em infecção rábica experimental têm destacado o papel protetor da apoptose na prevenção da disseminação viral, considerando-a como um dos mecanismos mais importantes do hospedeiro na defesa contra o vírus (Dietzschold et al., 2001; Yan et al., 2002; Warrell e Warrell, 2004).

Outros estudos experimentais têm sugerido que a apoptose tem um papel importante na patogênese da raiva, sendo a principal causa de morte neuronal na infecção (Jackson e Rossiter, 1997; Fu e Jackson, 2005; Ubol et al., 2005).

Por outro lado, Jackson et al. (2008) em estudo utilizando tecido cerebral parafinado de doze pacientes falecidos em decorrência da infecção rábica, não encontrou evidência morfológica de apoptose neuronal, concluindo que esta não tem papel patogênico importante na encefalite rábica humana.

Em nossa casuística encontramos de modo global maior número de células apoptóticas nos casos de raiva. Um fato que nos chamou atenção foi que a maioria dessas células apoptóticas não apresentava morfologia de neurônios. Somente pequeno número de células com aspecto histológico de neurônios mostrou reação positiva para caspase 3. Ao investigarmos através de reação imuno-histoquímica de dupla marcação quais células estariam em apoptose, verificamos que os linfócitos TCD4+ e TCD8+ estiveram duplamente marcados com a caspase 3, o que caracterizou apoptose dos mesmos. Não conseguimos detectar apoptose de células NK, de macrófagos e de astrócitos no SNC.

Estudos relatam que o vírus da raiva pode facilitar sua disseminação através de estratégias anti-apoptóticas, inibindo a ativação de caspases induzidas por receptores de morte, codificando análogos da proteína anti-apoptótica Bcl-2, inativando p53 ou secretando fator neurotrópico. Além de evitar a apoptose acentuada de neurônios e facilitar sua disseminação, o

vírus pode ainda causar apoptose de linfócitos T citotóxicos (CTL) e de células NK, prejudicando assim a resposta imune específica (Thoulouze et al., 1997; Baloul e Lafon, 2003).

Diante do encontro de poucos neurônios apoptóticos na raiva humana transmitida por morcegos podemos inferir que o vírus rábico utiliza mecanismos anti-apoptóticos para preservar neurônios infectados e assim assegurar sua permanência e replicação nessas células.

Na raiva a constatação de que outras células, que não os neurônios, estavam apoptóticas, nos fazem acreditar que a apoptose das células imunes seria um mecanismo utilizado pelo vírus para se precaver da ação inflamatória destrutiva dessas células.

Acreditamos que estudos mais aprofundados precisam ser desenvolvidos no sentido de caracterizar, em última análise, que balanço entre a apoptose de neurônios e de células imunes seria benéfico para o hospedeiro.

Em síntese, a inter-relação entre os diferentes eventos que ocorrem no SNC em casos de raiva humana transmitida por morcegos podem ser vistos na figura 32.

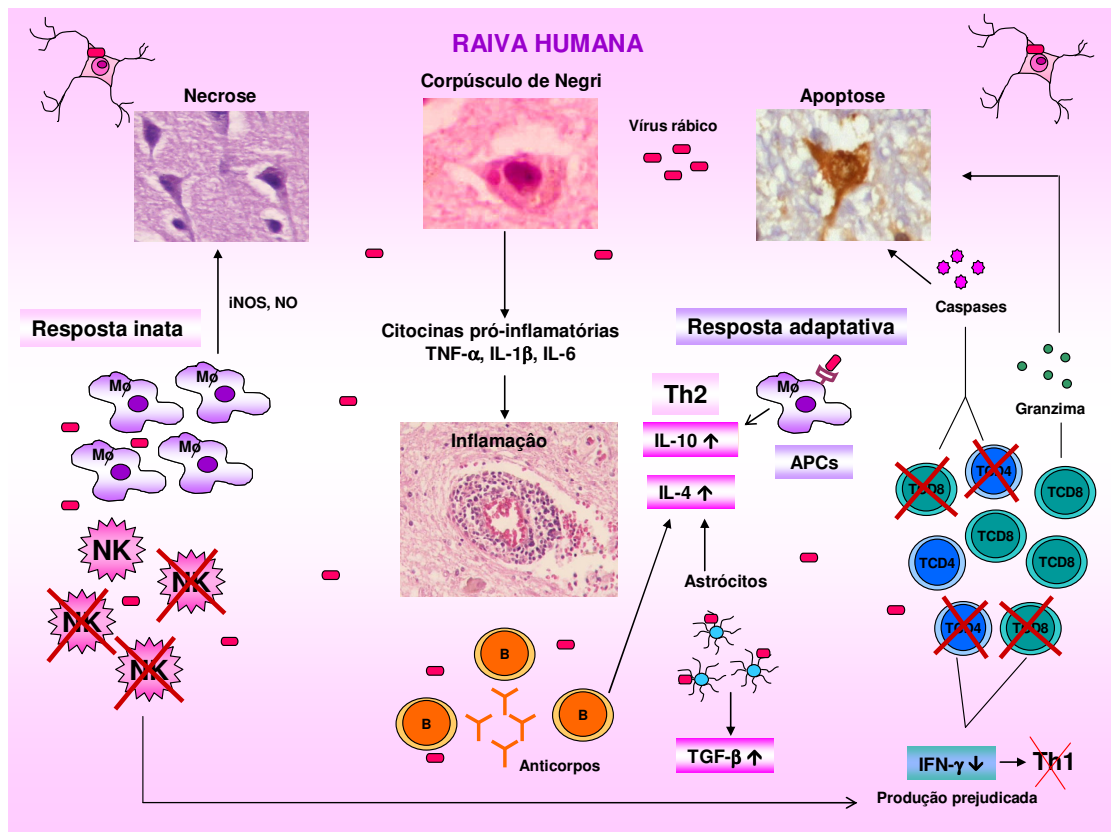


Figura 32. Esquema ilustrativo da imunopatogenia da raiva humana paralítica transmitida por morcegos no SNC

RT-PCR para detecção do vírus rábico em material parafinado de SNC

A possibilidade de detecção de ácidos nucleicos de agentes infecciosos em material parafinado abriu várias possibilidades principalmente para estudos retrospectivos de materiais remanescentes das décadas passadas em que nem se ouvia falar ainda na técnica de PCR aplicada a materiais emblocados em parafina.

Vários estudos têm demonstrado a utilização da PCR para detecção de DNA em material parafinado (Cao et al., 2003; Coura et al., 2005), contudo, o problema maior é quando tentamos extrair o RNA desse material, isso devido ao fato do RNA ser menos estável que o DNA e por isso sofre degradação mais facilmente, o que prejudica a sua detecção.

A detecção de RNA do vírus da raiva já foi demonstrada em material parafinado (Wacharapluesadee et al., 2006), porém muitos interferentes podem prejudicar essa detecção.

Nos casos de raiva ocorridos no Estado do Pará em 2004 e 2005, dos quais alguns deles fizeram parte da nossa casuística, o primeiro problema que pode ter interferido na extração de RNA viral foi a fixação e permanência dos cérebros por muito tempo em formol. Dados da literatura têm demonstrado que além da má fixação do material em formalina, a utilização da parafina para conservação também pode ter interferência na extração do RNA (Ben-Ezra et al., 1991; Godfrey et al., 2000; Chung et al., 2008).

A nossa intenção quando nós nos propusemos a realizar a RT-PCR nos casos de raiva, na verdade foi uma tentativa de padronização da técnica

em material parafinado, que nos será muito útil para outros estudos retrospectivos, como casos de raiva das décadas de 70 e 80. Infelizmente, nossa primeira tentativa de padronização da RT-PCR para detecção de RNA viral em material parafinado não foi bem sucedida, porém, futuramente novas tentativas, como a escolha de novos “primers” ou novos métodos de extração não devem ser descartadas.

CONCLUSÕES

7 - CONCLUSÕES

A investigação local no sistema nervoso central dos processos desencadeados pela raiva humana transmitida por morcegos nos permitiu concluir que:

O envolvimento do sistema nervoso central em decorrência da raiva se faz às custas de processo inflamatório com predomínio local de linfócitos TCD8+, um padrão Th2 de expressão de citocinas, acometendo os microambientes meningeal, perivascular e intraparenquimatoso, sendo o bulbo a região mais afetada.

A análise mais aprofundada dos eventos presentes no sistema nervoso central permitiu as seguintes conclusões específicas:

1- A avaliação histopatológica do SNC na raiva humana permitiu definir o processo como uma meningoencefalomielite, acometendo o microambiente perivascular, intraparenquimatoso, bem como meningeal.

2 - A distribuição ampla e difusa do antígeno viral no SNC tem aplicação prática relevante, porque dá subsídio para a utilização da técnica imuno-histoquímica para o diagnóstico de raiva, independente da região específica do SNC disponível para apreciação.

3- O processo inflamatório se deu concomitantemente com a presença de corpúsculos de Negri e de material antigênico nas diferentes regiões do SNC.

4- A demonstração de antígenos do vírus da raiva nas células mononucleadas dos vasos intraparenquimatosos, nas células endoteliais e nos astrócitos poderia assinalar uma rota alternativa através da qual o vírus da raiva teria acesso aos neurônios, indicando assim uma via hematogênica de infecção neuronal.

5- Através da avaliação dos eventos que ocorreram localmente no parênquima cerebral caracterizamos uma resposta inexpressiva das células NK frente à agressão viral. Tal fato poderia representar o resultado da interferência direta do vírus nos receptores de ativação e inibição dessas células, fazendo com que as mesmas perdessem sua atividade citotóxica.

6- Pudemos observar um aumento das células expressando IL-12 nos casos de raiva. A verificação desse comportamento poderia ter respaldo na interpretação de que os pacientes acometidos pela raiva são imunocompetentes de base e sua produção aumentada refletiria uma resposta ao estímulo infeccioso.

7- Constatamos aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-6 e TNF α , assim como de iNOS nos casos de raiva humana. Correlacionando-se esses resultados com a ação já demonstrada dessas citocinas, podemos concluir que as mesmas atuando no sítio das lesões devem favorecer dano neuronal.

8- A análise quantitativa dos linfócitos TCD4+ mostrou, originalmente em casos humanos, depleção dos mesmos no ambiente intraparenquimatoso, o que certamente contribuiu para o desfecho fatal da meningoencefalopatia desencadeada pelo vírus da raiva, quando se leva em conta o seu papel protetor já demonstrado experimentalmente.

9- O pequeno comparecimento local de linfócitos B na nossa casuística de raiva poderia em parte resultar da diminuição da ativação dos mesmos em decorrência da depleção local de linfócitos TCD4+, o que refletiria a inter-relação de cooperação imune entre essas células.

10- Os linfócitos TCD8+ foram as células inflamatórias encontradas em maior abundância nos três microambientes (meningeal, perivascular e intraparenquimatoso). Entretanto, a ausência de uma correlação positiva entre os linfócitos TCD8+ e a expressão local de granzima sugere que o papel efetor citotóxico dessas células poderia estar prejudicado no sítio das lesões.

11- Encontramos quantidades ínfimas de IFN- γ nos casos de raiva, o que ocorreu em concomitância com a diminuição no número de linfócitos TCD4+ e células NK. A falta de resposta efetiva das células NK à infecção rábica e o comprometimento da resposta imune adaptativa seqüencial, demonstrada pela depleção de linfócitos TCD4+ e prejuízo da atividade citotóxica dos linfócitos TCD8+, deve ser reflexo da manipulação do vírus sobre a resposta imune do hospedeiro, impedindo fundamentalmente a produção de IFN- γ .

12- A baixa expressão local de IL-2r nos casos de raiva humana, aliada à baixa expressão de granzima, a expressão ínfima de IFN- γ e a diminuição de células TCD4, provavelmente reflete ativação prejudicada das células imunes, dificultando a ativação de linfócitos específicos para o clareamento do vírus rábico.

13- Nos casos de raiva encontramos alta expressão de IL-4 e IL-10 nos três microambientes do SNC. O aumento local da expressão dessas duas citocinas favoreceria um padrão Th2 de resposta imune, interferindo dessa maneira no esperado efeito antiviral que uma resposta de perfil Th1 poderia ocasionar.

14- A importante expressão de TGF- β , que esteve aumentada nos casos de raiva quando comparada aos casos controles, poderia ser mais uma tentativa do cérebro em manter sua rede neuronal intacta, freando uma resposta imune exacerbada. Por outro lado, a produção de TGF- β por astrócitos além de diminuir o risco de destruição neuronal, poderia também favorecer a permanência do vírus no SNC.

15- Nos casos de raiva, a verificação de grau pouco acentuado de neurônios apoptóticos em contraposição a apoptose expressiva de linfócitos TCD4+ e TCD8+, indicaria a utilização pelo vírus de mecanismos ora anti-apoptóticos para preservar neurônios e favorecer a disseminação viral, ora pró-apoptóticos, destruindo linfócitos e atenuando o processo inflamatório.

ANEXOS

8 - ANEXOS

Anexo A. Aprovação da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25.06.08 **APROVOU Adendo ao Projeto** referente ao Protocolo de Pesquisa nº **057/05**, intitulado: **“Morte neuronal e resposta inflamatória “in situ” em sistema nervoso central de pacientes com infecção rábica transmitida por morcegos”**, apresentado pelo Departamento de **Patologia** .

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte**

CAPPesq, 25 de junho de 2008.

Prof.Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo B. Raiva: contagem de células infectadas com vírus da raiva, células inflamatórias, células expressando citocinas e outros marcadores nos microambientes e regiões do SNC

Raiva: contagem de neurônios e células gliais imunomarcados com o vírus rábico por mm² no microambiente intraparenquimatoso

Casos	Neurônios	Células gliais
N320/04A	0,533	0,533
N320/04B	NHB	NHB
N320/04E	4,267	0,533
N320/04F	14,933	3,2
N320/04J	5,867	0,533
N320/04L	5,867	0
N321/04A	8	3,2
N321/04B	9,6	9,067
N321/04E	11,733	9,067
N321/04F	2,667	6,4
N321/04J	20,8	4,8
N321/04L	31,467	4,267
N322/04A	1,067	19,733
N322/04B	4,267	18,133
N322/04E	11,733	9,067
N322/04F	0,533	2,133
N322/04J	NHB	NHB
N322/04L	9,6	5,333
N323/04A	8,533	1,067
N323/04B	22,933	2,133
N323/04E	NHB	NHB
N323/04F	4,8	2,133
N323/04J	2,667	0
N323/04L	0,533	0,533
N331/04A	3,2	0,533
N331/04B	52,267	2,667
N331/04E	NHB	NHB
N331/04F	38,933	9,6
N331/04J	11,733	1,067
N331/04L	NHB	NHB
N355/05A	1,6	0
N355/05B	11,733	3,733
N355/05E	NHB	NHB
N355/05F	1,6	19,733
N355/05J	20,267	1,067
N355/05L	27,2	3,733
N360/05A	0	0
N360/05B	9,6	1,067
N360/05E	0	0
N360/05F	9,6	3,2
N360/05J	0	0
N360/05L	16	2,133
N361/05A	4,267	4,8
N361/05B	3,733	7,467
N361/05E	2,667	2,667
N361/05F	2,133	11,733
N361/05J	8,533	0,533
N361/05L	5,333	0

NHB: não havia bloco

Raiva: contagem de células imunomarcadas por mm² na meninge

Casos	CD4	CD8	CD20	CD57	CD68	GFAP
N320/04A	4,8	91,2	3,2	0	3,2	0
N320/04B	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N320/04E	25,6	33,6	4,8	8	NHM	0
N320/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N320/04J	10,667	NHM	8	NHM	0	NHM
N320/04L	198,4	80	20	0	8	1,6
N321/04A	16	102,4	6,4	1,6	11,2	0
N321/04B	12,8	116,8	3,2	6,4	24	0
N321/04E	59,2	112	2,285	24	25,6	0
N321/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N321/04J	112	6,4	NHM	NHM	11,2	0
N321/04L	4,8	52,8	6,4	0	19,2	0
N322/04A	0	78,4	0	9,6	9,6	1,6
N322/04B	0	91,2	0	3,2	3,2	0
N322/04E	0	22,4	20,8	6,4	14,4	0
N322/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N322/04J	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N322/04L	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N323/04A	0	56	0	19,2	0	0
N323/04B	0	8	0	0	2,667	0
N323/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N323/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N323/04J	0	48	0	11,2	0	0
N323/04L	16	72	30,4	1,6	12,9	0
N331/04A	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N331/04B	3,2	25,6	0	3,2	0	0
N331/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N331/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N331/04J	0	60,8	0	35,2	1,6	0
N331/04L	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05A	0	22,4	0	4,8	4,8	0
N355/05B	0	30,4	0	0	28,8	0
N355/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N355/05J	4,8	110,4	132,8	0	36,8	0
N355/05L	1,6	81,6	4,8	0	9,6	0
N360/05A	0	16	0	0	11,2	0
N360/05B	0	8	4,8	0	11,2	0
N360/05E	0	129,6	19,2	0	4,8	0
N360/05F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N360/05J	0	19,2	0	0	0	0
N360/05L	1,6	88	3,2	1,6	11,2	0
N361/05A	0	24	0	0	70,4	0
N361/05B	0	NHM	1,6	0	6,4	0
N361/05E	0	20,8	1,6	0	16	0
N361/05F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N361/05J	0	8	0	0	6,4	0
N361/05L	0	4,8	0	0	1,6	0

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo
 NHB: não havia bloco; NHM: não havia meninge

Raiva: contagem de células imunomarcadas expressando citocinas por mm² na meninge

Casos	TNF- α	IFN- γ	TGF- β	IL1- β	IL-2R	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12
N320/04A	0	0	0	3,2	0	16	4,8	4,8	0
N320/04B	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N320/04E	14,4	0	3,2	16	0	6,4	9,6	16	8
N320/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N320/04J	0	NHM	NHM	NHM	0	NHM	NHM	NHM	NHM
N320/04L	8	3,2	0	1,6	4,8	0	1,6	3,2	1,6
N321/04A	14,4	0	3,2	4,8	8	11,2	3,2	9,6	0
N321/04B	6,4	0	0	48	3,2	9,6	0	6,4	11,2
N321/04E	24	4,8	1,6	14,4	22,4	12,8	1,6	22,4	12,8
N321/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N321/04J	NHM	NHM	4	4	0	30	0	0	0
N321/04L	30,4	0	0	NHM	0	6,4	0	8	8
N322/04A	1,6	0	3,2	0	0	20,8	12,8	1,6	14,4
N322/04B	0	0	4,8	0	0	8	3,2	0	24
N322/04E	8	0	0	0	0	12,8	4,8	9,6	17,6
N322/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N322/04J	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N322/04L	NHM	0	0	NHM	NHM	0	NHB	4,8	14,4
N323/04A	0	0	1,6	0	0	17,6	0	27,2	6,4
N323/04B	0	0	11,428	0	1,6	0	NHM	1,6	0
N323/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N323/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N323/04J	0	0	1,6	0	1,6	11,2	0	8	0
N323/04L	2,285	0	4,8	11,2	0	1,6	9,6	35,2	6,4
N331/04A	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N331/04B	0	0	6,4	0	0	0	11,2	0	0
N331/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N331/04F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N331/04J	25,6	0	1,6	1,6	0	8	0	1,6	0
N331/04L	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05A	6,4	0	11,2	0	0	0	0	0	1,6
N355/05B	0	0	4,8	0	0	3,2	0	1,6	6,4
N355/05E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N355/05J	9,6	0	11,2	0	0	0	0	1,6	9,6
N355/05L	0	0	6,4	0	0	0	0	3,2	0
N360/05A	8	0	12,8	0	0	1,6	0	0	6,4
N360/05B	0	0	1,6	0	0	0	0	1,6	1,6
N360/05E	1,6	0	11,2	0	1,6	0	0	0	9,6
N360/05F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N360/05J	1,6	0	1,6	0	0	0	0	1,6	3,2
N360/05L	0	0	8	0	0	1,6	0	11,2	6,4
N361/05A	0	0	0	0	0	0	0	3,2	6,4
N361/05B	0	0	4,8	0	0	0	0	3,2	3,2
N361/05E	1,6	0	0	0	0	0	0	3,2	9,6
N361/05F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
N361/05J	0	0	1,6	0	0	0	0	0	0
N361/05L	3,2	0	3,2	0	0	0	0	3,2	1,6

A: córtex frontal; **B:** córtex parietal; **E:** hipocampo; **F:** núcleos da base; **J:** cerebelo; **L:** bulbo

NHB: não havia bloco; **NHM:** não havia meninge

Raiva: contagem de células expressando outros imunomarcadores por mm² na meninge

Casos	Granzima	iNOS	Caspase 3
N320/04A	0	8	1,6
N320/04B	NHB	NHB	NHB
N320/04E	0	6,4	NHM
N320/04F	NHM	NHM	NHM
N320/04J	NHM	0	0
N320/04L	1,6	0	0
N321/04A	0	27,2	0
N321/04B	0	19,2	0
N321/04E	0	54,4	0
N321/04F	NHM	NHM	NHM
N321/04J	0	6	0
N321/04L	0	12,8	1,6
N322/04A	0	24	1,6
N322/04B	3,2	40	0
N322/04E	0	8	1,6
N322/04F	NHM	NHM	NHM
N322/04J	NHB	NHB	NHB
N322/04L	NHB	19,2	NHB
N323/04A	1,6	14,4	1,6
N323/04B	0	6,4	0
N323/04E	0	NHB	0
N323/04F	NHM	NHM	NHM
N323/04J	3,2	11,2	0
N323/04L	3,2	0	0
N331/04A	6,857	NHM	NHM
N331/04B	NHM	0	0
N331/04E	NHB	NHB	NHB
N331/04F	NHM	NHM	NHM
N331/04J	3,2	17,6	0
N331/04L	NHB	NHB	NHB
N355/05A	0	3,2	0
N355/05B	0	4,8	0
N355/05E	NHB	NHB	NHB
N355/05F	NHM	NHM	NHM
N355/05J	4,8	0	3,2
N355/05L	1,6	1,6	0
N360/05A	0	3,2	0
N360/05B	9,6	0	0
N360/05E	0	0	0
N360/05F	NHM	NHM	NHM
N360/05J	4,8	0	0
N360/05L	6,4	0	0
N361/05A	80	0	0
N361/05B	11,2	1,6	1,6
N361/05E	6,4	0	0
N361/05F	NHM	NHM	NHM
N361/05J	16	0	0
N361/05L	4,8	0	0

A:córtex frontal; **B:** córtex parietal; **E:** hipocampo; **F:** núcleos da base; **J:** cerebelo; **L:** bulbo

NHB: não havia bloco; **NHM:** não havia meninge

Raiva: contagem de células imunomarcadas por mm² no microambiente perivascular

Casos	CD4	CD8	CD20	CD57	CD68	GFAP
N320/04A	0	3,2	0	0,533	1,067	1,6
N320/04B	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N320/04E	1,6	0	5,867	0	8	0
N320/04F	20,267	0	10,667	1,067	3,733	0,533
N320/04J	0	4,8	0	0	0	0
N320/04L	8,533	0	41,6	0,533	10,667	1,067
N321/04A	8	11,2	8,533	0,533	2,133	0
N321/04B	0	1,067	0	1,067	0	4,267
N321/04E	10,133	5,333	1,067	0,533	0	0
N321/04F	9,067	44,267	1,067	0	2,667	3,2
N321/04J	0	9,067	0	0	0,533	0
N321/04L	0,533	10,133	0,533	0	1,067	0
N322/04A	0	17,067	0,533	4,267	0	0
N322/04B	0	7,467	3,2	0	0	1,067
N322/04E	0	12,8	0	0	0	1,067
N322/04F	0	1,067	0	0	0	0
N322/04J	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N322/04L	1,067	11,733	6,933	1,6	1,067	1,067
N323/04A	0	5,867	0	0,533	1,067	2,133
N323/04B	0	7,467	0	0	1,6	0
N323/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N323/04F	0	4,8	2,133	2,133	2,667	1,6
N323/04J	0	0	0	0	0	0
N323/04L	0	27,733	14,4	0	5,333	0
N331/04A	0	3,2	0	0,533	0	0
N331/04B	0	5,333	0,533	0	0,533	0,533
N331/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N331/04F	0	8	0,533	1,6	1,067	1,6
N331/04J	0	1,067	0	0	2,133	0,533
N331/04L	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05A	0	1,067	0	0	0,533	0
N355/05B	0	3,2	0	0	3,2	1,6
N355/05E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05F	0	5,333	1,067	0	13,333	1,067
N355/05J	0	2,133	0	1,067	2,667	1,6
N355/05L	0,533	0,533	3,2	0,533	2,133	0
N360/05A	0	2,133	0	0	2,133	0
N360/05B	0	1,067	0	0	1,6	0,533
N360/05E	0	0	0	0	0	0,533
N360/05F	0	12,267	0	0	3,2	0
N360/05J	0	0	0	0	1,067	0,533
N360/05L	0	56,53	2,667	0	3,2	0,533
N361/05A	0	2,133	0	0	5,867	0,533
N361/05B	0	1,6	0	0	1,6	0
N361/05E	0	0	0	0	0	0
N361/05F	0	13,867	0,533	1,067	3,2	0
N361/05J	0	0	0	0	0	0,533
N361/05L	0	4,8	0	0	1,067	0

A: córtex frontal; **B:** córtex parietal; **E:** hipocampo; **F:** núcleos da base; **J:** cerebelo; **L:** bulbo

NHB: não havia bloco

Raiva: contagem de células imunomarcadas expressando citocinas por mm² no microambiente perivascular

Casos	TNF- α	IFN- γ	TGF- β	IL1- β	IL-2R	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12
N320/04A	0	0	1,6	0	0	1,6	0	0	0,533
N320/04B	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N320/04E	0	0	0	0	0	2,667	0,533	0	0
N320/04F	1,6	0	0	0	0	8,533	2,667	0	1,067
N320/04J	0	0,533	0	0	0	0	0	0	0
N320/04L	2,667	0	0,533	0	0	2,667	0,533	0	0
N321/04A	1,067	0	2,667	6,4	0	4,267	0	2,133	0
N321/04B	0	0	0	0	0	12,267	0	0	0
N321/04E	1,067	0	0,533	0	0	2,133	0	0	0
N321/04F	0	0	0,533	0	0	2,667	1,067	2,133	0
N321/04J	0	0	0,533	0	0	0	0,533	0	0,533
N321/04L	0	0	0	0	0	3,733	0	0	0
N322/04A	2,667	0	0	0	0	9,6	0	0,533	0
N322/04B	0	0	0	0	0	22,933	0,533	2,667	0
N322/04E	1,067	0,533	0	0	0	10,133	1,6	1,6	0
N322/04F	0	0	0,533	0	0	8	0	2,667	0,533
N322/04J	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N322/04L	0,533	0	4,267	0	0	1,067	NHB	0	0
N323/04A	0	0	3,2	0	0	0	0	0,533	0
N323/04B	0	0	3,733	0	0	0	0	0,533	0
N323/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N323/04F	0	0	0,533	0	0	0	0	0	0
N323/04J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N323/04L	0	0	0,533	0	0	0,533	2,133	0	0
N331/04A	0	0	1,067	0	0	0	0	0	0
N331/04B	0	0	3,2	0	0	0	0	0	0
N331/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N331/04F	0	0	0	0	0	0,533	0	0	0
N331/04J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N331/04L	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05A	0,533	0	3,733	0	0	0	0	1,067	0
N355/05B	1,067	0	12,8	0	0	0	0	0	3,733
N355/05E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05F	1,067	0	3,2	0	0	0	0	2,133	1,6
N355/05J	0	0	2,667	0	0	0,533	0	0	0,533
N355/05L	0,533	0	10,133	0	0	0	0	0,533	2,133
N360/05A	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0
N360/05B	0	0	0	0	0	0	0	0,533	0
N360/05E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N360/05F	2,667	0	3,2	0	0	0	0	4,267	0
N360/05J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N360/05L	0,533	0	4,267	0	0	0	0	5,867	2,667
N361/05A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N361/05B	2,133	0	0	0	0	0	0	0,533	0
N361/05E	0	0,533	0	0	0	0	0	0,533	0
N361/05F	1,067	0	0	0	0	0	0	5,867	3,733
N361/05J	0	0	0	0	0	0	0	0,533	0
N361/05L	1,6	0	0	0	0	0	0	13,333	0,533

A: córtex frontal; **B:** córtex parietal; **E:** hipocampo; **F:** núcleos da base; **J:** cerebelo; **L:** bulbo

NHB: não havia bloco

Raiva: contagem de células expressando outros imunomarcadores por mm² no microambiente perivascular

Casos	Granzima	iNOS	Caspase 3
N320/04A	0	0	0
N320/04B	NHB	NHB	NHB
N320/04E	0	3,733	1,067
N320/04F	0	3,2	0
N320/04J	0	0	0
N320/04L	0	0	0
N321/04A	0	1,067	0,533
N321/04B	0	0	0
N321/04E	0	1,067	0
N321/04F	2,133	4,267	2,133
N321/04J	0	0,533	0
N321/04L	0	0,533	2,133
N322/04A	0	0	0,533
N322/04B	0	0	2,133
N322/04E	2,133	0	0
N322/04F	2,667	0	0
N322/04J	NHB	NHB	NHB
N322/04L	NHB	10,133	NHB
N323/04A	0	0	0
N323/04B	0,533	0	1,6
N323/04E	1,067	0	0
N323/04F	0,533	0	0
N323/04J	0	0	0
N323/04L	2,667	0,533	0
N331/04A	0	0	0
N331/04B	2,667	0,533	1,067
N331/04E	NHB	NHB	NHB
N331/04F	0	0	0,533
N331/04J	0	0	0
N331/04L	NHB	NHB	NHB
N355/05A	0	0,533	0
N355/05B	0	0,533	0
N355/05E	NHB	NHB	NHB
N355/05F	2,133	3,2	0
N355/05J	0	0	0
N355/05L	1,6	0	0
N360/05A	0	0	0
N360/05B	0	0,533	0
N360/05E	0	1,067	0
N360/05F	2,667	0	0
N360/05J	0	0	0
N360/05L	1,067	0	0
N361/05A	1,067	0	0
N361/05B	1,6	0,533	0
N361/05E	1,067	0	0
N361/05F	1,067	0,533	0
N361/05J	1,067	0	0
N361/05L	2,133	0	0,533

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

NHB: não havia bloco

Raiva: contagem de células imunomarcadas por mm² no microambiente intraparenquimatoso

Casos	CD4	CD8	CD20	CD57	CD68	GFAP
N320/04A	0	24	2,133	1,067	0	17,067
N320/04B	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N320/04E	0	35,2	0	0	41,6	8,533
N320/04F	13,867	62,4	2,667	2,667	1,6	11,733
N320/04J	0	1,6	0,533	0	0	9,067
N320/04L	52,267	281,6	8,533	1,067	71,467	1,6
N321/04A	4,267	52,267	6,4	0	61,333	1,6
N321/04B	0,533	107,733	1,6	0	43,733	30,4
N321/04E	16,533	109,867	1,6	1,067	25,067	17,067
N321/04F	0	83,2	1,067	1,067	73,067	15,467
N321/04J	1,6	30,933	2,133	0,533	56	22,933
N321/04L	0	43,2	0,533	0	10,133	3,733
N322/04A	0	187,733	0	3,2	11,733	6,4
N322/04B	0	121,6	0	0,533	18,133	41,6
N322/04E	0	123,733	1,6	0	89,067	2,667
N322/04F	0	126,4	0	1,6	36,267	23,467
N322/04J	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N322/04L	0	125,333	2,133	3,73	205,867	21,867
N323/04A	0	5,333	0	1,067	1,067	25,067
N323/04B	0	2,133	0	0	3,733	12,8
N323/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N323/04F	0	0	5,333	4,267	21,333	43,2
N323/04J	0	5,333	0	2,667	2,667	7,467
N323/04L	3,2	109,867	7,467	18,667	148,267	1,067
N331/04A	0	1,067	0	2,133	0	22,933
N331/04B	0	9,067	0	0,533	0,533	34,133
N331/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N331/04F	0	7,467	1,067	4,8	32,533	19,733
N331/04J	0	5,867	0	4,267	7,467	2,667
N331/04L	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05A	0	1,067	0	0	9,067	7,467
N355/05B	0	14,933	1,067	1,067	13,867	27,733
N355/05E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05F	0,533	9,067	1,6	17,6	47,467	21,333
N355/05J	1,067	24	3,2	1,067	35,2	22,4
N355/05L	0	30,4	7,467	1,6	20,8	8,533
N360/05A	0	0	0	0	6,4	6,4
N360/05B	0	1,6	0	0	1,067	42,133
N360/05E	0	2,13	0	0	2,133	11,2
N360/05F	0	8,533	0	0	14,933	19,2
N360/05J	0	0,533	0	0	1,6	2,133
N360/05L	0	72	2,667	0	53,333	9,6
N361/05A	0	1,067	0	0	18,667	26,133
N361/05B	0	5,333	0,533	0	4,8	15,467
N361/05E	0	1,6	0	1,067	4,267	8,533
N361/05F	0,533	27,733	0	2,133	33,6	17,067
N361/05J	0	3,2	0	0	2,133	10,133
N361/05L	0	3,2	1,067	3,733	5,333	5,333

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

NHB: não havia bloco

Raiva: contagem de células imunomarcadas expressando citocinas por mm² no microambiente intraparenquimatoso

Casos	TNF- α	IFN- γ	TGF- β	IL1- β	IL-2R	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12
N320/04A	0	0,533	11,733	0,533	0	0,533	0,533	4,267	6,933
N320/04B	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N320/04E	10,667	2,133	13,867	8,533	0	2,667	3,2	3,733	0,533
N320/04F	1,067	1,067	11,733	16	0	3,733	2,133	0	5,333
N320/04J	0,533	0,533	20,8	0	0	2,667	3,2	0,533	5,867
N320/04L	8	0,533	8,533	0,533	0	32	8	7,467	18,667
N321/04A	1,6	0	14,4	8,533	0	11,2	1,067	3,2	0
N321/04B	1,067	0,533	21,867	10,667	0	2,667	1,067	1,6	1,067
N321/04E	1,067	1,067	10,133	5,333	0	0,533	0	0	0
N321/04F	2,133	1,067	19,2	2,667	0	0	0	24,533	1,6
N321/04J	4,8	1,067	6,933	0,533	0	2,667	0,533	1,067	1,067
N321/04L	2,133	0,533	13,867	0,533	0,533	3,2	12,8	6,4	8
N322/04A	6,933	4,267	3,2	0,533	0	17,6	2,667	1,6	2,667
N322/04B	0,533	1,067	2,133	2,667	0	1,6	0,533	1,6	2,133
N322/04E	10,133	0	5,333	0,533	0	15,467	1,067	6,4	1,067
N322/04F	13,333	0	0,533	0	0	2,667	1,6	0,533	0,533
N322/04J	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N322/04L	30,4	0	28,267	0	0	3,733	NHB	0,533	3,2
N323/04A	0,533	0	4,8	0	0	0,533	2,133	4,8	0
N323/04B	0,533	0	5,333	0	0	0	0	0,533	0,533
N323/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N323/04F	1,6	0,533	2,667	0,533	0	0	0	0,533	0
N323/04J	0,533	0	10,133	1,067	0	0,533	0	0,533	0
N323/04L	0,533	0	23,467	5,333	0	7,467	2,667	6,4	3,2
N331/04A	0	0	4,267	1,6	0,533	0,533	0	4,267	1,6
N331/04B	0	0	7,467	0	1,067	1,067	2,133	3,733	0
N331/04E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N331/04F	0	0	5,333	0	0	1,6	0	1,067	1,6
N331/04J	1,6	0,533	1,6	0	0	2,667	0	0,533	2,667
N331/04L	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05A	0	0	5,867	0	0	0	0	0	0
N355/05B	11,733	0	10,667	0	0	0	0	0	1,6
N355/05E	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB	NHB
N355/05F	28,267	0	19,2	0	0	0	0	3,733	0
N355/05J	6,933	0	20,8	0	0	0	0	0,533	1,6
N355/05L	1,067	0	6,933	0	0	0	0	4,267	2,667
N360/05A	0	0	0,533	0	0	0	0	0,533	0
N360/05B	0,533	0	0	0	0	0	0	1,6	0
N360/05E	0	0	0	0	0	0	0	0	0,533
N360/05F	3,2	0	1,067	0	0	0	0	3,733	0
N360/05J	0,533	0	0	0	0	0	0	1,6	1,067
N360/05L	1,6	0	0,533	0	0	0	0	3,733	1,067
N361/05A	0	0,533	0	0	0	0	0	2,133	0
N361/05B	4,267	0	0	0	0	0	0	1,6	0
N361/05E	0,533	0,533	0	0	0	0	0	0,533	0,533
N361/05F	12,8	0	0	0	0	0	0	9,067	0
N361/05J	11,733	0	0,533	0	0	0	0	0	1,067
N361/05L	8,533	0	3,2	0	0	0	0	2,667	1,067

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

NHB: não havia bloco

Raiva: contagem de células expressando outros imunomarcadores por mm² no microambiente intraparenquimatoso

Casos	Granzima	iNOS	Caspase 3
N320/04A	0,533	18,133	0
N320/04B	NHB	NHB	NHB
N320/04E	0	0,533	1,6
N320/04F	13,867	23,467	0
N320/04J	0	0	0
N320/04L	0,533	12,267	0,533
N321/04A	0	4,267	1,6
N321/04B	0	11,733	0
N321/04E	0,533	6,4	0
N321/04F	4,267	8	12,267
N321/04J	2,13	7,467	23,467
N321/04L	0,533	8	39,467
N322/04A	1,6	2,667	0,533
N322/04B	3,2	25,067	11,733
N322/04E	1,6	1,067	2,667
N322/04F	6,4	2,133	0
N322/04J	NHB	NHB	NHB
N322/04L	NHB	30,4	NHB
N323/04A	0	2,133	1,6
N323/04B	0	2,667	10,667
N323/04E	NHB	NHB	NHB
N323/04F	1,6	0	4,8
N323/04J	0	0,533	20,267
N323/04L	12,8	1,067	11,2
N331/04A	9,6	1,067	0
N331/04B	9,067	0,533	1,067
N331/04E	NHB	NHB	NHB
N331/04F	1,067	2,667	14,4
N331/04J	7,467	1,6	17,6
N331/04L	NHB	NHB	NHB
N355/05A	0	0	0
N355/05B	1,6	0	0
N355/05E	NHB	NHB	NHB
N355/05F	2,667	2,133	0
N355/05J	5,333	0,533	0
N355/05L	5,867	1,067	1,067
N360/05A	0,533	0	0
N360/05B	2,667	0	2,667
N360/05E	0,533	0,533	0
N360/05F	1,067	0,533	0,533
N360/05J	0	0	0
N360/05L	0	0	7,467
N361/05A	3,733	0	0
N361/05B	4,8	0	0
N361/05E	0	0	0
N361/05F	1,6	0	0
N361/05J	14,4	1,6	0
N361/05L	9,067	0	0

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

NHB: não havia bloco

Anexo C. Grupo controle: contagem células inflamatórias, células expressando citocinas e outros marcadores nos microambientes e regiões do SNC

Grupo controle: contagem de células imunomarcadas por mm² na meninge

Casos	CD4	CD8	CD20	CD57	CD68	GFAP
HC07/276A	4,8	17,6	3,2	0	0	0
HC07/276B	3,2	0	0	0	0	0
HC07/276E	0	1,6	0	0	2,67	0
HC07/276F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/276J	3,2	6,4	0	0	0	0
HC07/276L	0	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/315A	0	0	0	0	0	0
HC07/315B	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/315E	3,2	0	0	0	3,2	0
HC07/315F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/315J	4,8	1,6	0	0	0	0
HC07/315L	0	3,2	0	0	0	0
HC07/369A	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/369B	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/369E	4,571	0	0	0	0	0
HC07/369F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/369J	1,6	0	0	0	8	0
HC07/369L	1,6	0	0	0	0	0
SVO3376/08A	0	0	4,8	0	0	0
SVO3376/08B	3,2	6,4	3,2	1,6	0	0
SVO3376/08E	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3376/08J	0	0	0	1,6	3,2	0
SVO3376/08L	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08A	0	4,8	0	0	0	0
SVO3474/08B	0	0	0	1,6	0	0
SVO3474/08E	0	0	0	0	4,8	0
SVO3474/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3474/08J	0	17,6	0	0	0	0
SVO3474/08L	NHM	0	0	0	0	0
SVO3660/08A	3,2	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3660/08B	0	0	0	0	4,8	0
SVO3660/08E	4,8	0	0	1,6	1,6	0
SVO3660/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3660/08J	0	0	0	0	3,2	0
SVO3660/08L	1,6	0	0	NHM	0	0
SVO3884/08A	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08B	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08E	0	0	0	NHM	0	0
SVO3884/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3884/08J	0	0	0	0	3,2	0
SVO3884/08L	NHM	0	0	0	0	0
SVO3891/08A	0	0	NH	0	0	NH
SVO3891/08B	1,6	0	0	0	1,6	0
SVO3891/08E	0	0	0	1,6	0	0
SVO3891/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3891/08J	1,6	0	0	0	3,2	0
SVO3891/08L	0	0	0	0	0	0

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

NHB: não havia bloco; NHM: não havia meninge

Grupo controle: contagem de células imunomarcadas expressando citocinas por mm² na meninge

Casos	TNF- α	IFN- γ	TGF- β	IL1- β	IL-2R	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12
HC07/276A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/276J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276L	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/315A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315B	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/315E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/315J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/369A	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/369B	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/369E	0	0	0	1,6	0	0	0	0	0
HC07/369F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
HC07/369J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/369L	1,6	0	4,8	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6
SVO3376/08E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3376/08J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08A	0	0	1,6	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3474/08J	0	0	1,6	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08L	0	0	0	0	NHM	0	0	0	0
SVO3660/08A	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3660/08B	0	0	1,6	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3660/08J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08A	0	0	1,6	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3884/08J	0	0	4,8	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08L	0	0	0	0	0	NHM	0	0	NHM
SVO3891/08A	NHM	0	1,6	NHM	0	0	0	NHM	0
SVO3891/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08F	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM	NHM
SVO3891/08J	0	0	1,6	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08L	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A:córtex frontal; **B:** córtex parietal; **E:** hipocampo; **F:** núcleos da base; **J:** cerebelo; **L:** bulbo

NHB: não havia bloco; **NHM:** não havia meninge

Grupo controle: contagem de células expressando outros imunomarcadores por mm² na meninge

Casos	Granzima	iNOS	Caspase 3
HC07/276A	1,6	0	0
HC07/276B	0	0	0
HC07/276E	0	0	0
HC07/276F	NHM	NHM	NHM
HC07/276J	49,6	6,857	0
HC07/276L	NHM	NHM	NHM
HC07/315A	0	0	0
HC07/315B	NHM	NHM	NHM
HC07/315E	0	0	0
HC07/315F	NHM	NHM	NHM
HC07/315J	0	0	0
HC07/315L	0	0	0
HC07/369A	NHM	NHM	NHM
HC07/369B	NHM	NHM	NHM
HC07/369E	0	0	0
HC07/369F	NHM	NHM	NHM
HC07/369J	0	0	0
HC07/369L	0	0	0
SVO3376/08A	0	0	0
SVO3376/08B	0	0	0
SVO3376/08E	0	0	0
SVO3376/08F	NHM	NHM	NHM
SVO3376/08J	0	0	0
SVO3376/08L	0	0	0
SVO3474/08A	0	3,2	0
SVO3474/08B	0	0	0
SVO3474/08E	0	0	0
SVO3474/08F	NH	NH	NH
SVO3474/08J	0	1,6	0
SVO3474/08L	0	0	0
SVO3660/08A	NHM	NHM	NHM
SVO3660/08B	3,2	0	0
SVO3660/08E	0	0	0
SVO3660/08F	NHM	NHM	NHM
SVO3660/08J	0	0	0
SVO3660/08L	0	0	0
SVO3884/08A	0	0	0
SVO3884/08B	6,4	1,6	0
SVO3884/08E	0	0	0
SVO3884/08F	NHM	NHM	NHM
SVO3884/08J	0	0	0
SVO3884/08L	NHM	NHM	NHM
SVO3891/08A	NHM	NHM	NHM
SVO3891/08B	0	3,2	0
SVO3891/08E	0	1,6	0
SVO3891/08F	NHM	NHM	NHM
SVO3891/08J	0	0	0
SVO3891/08L	0	0	0

A:córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

NHB: não havia bloco; NHM: não havia meninge

Grupo controle: contagem de células imunomarcadas por mm² no microambiente perivascular

Casos	CD4	CD8	CD20	CD57	CD68	GFAP
HC07/276A	0	0	0	0	0,533	0
HC07/276B	0	0	0	0	0	0
HC07/276E	0	0	0	0	1,067	0
HC07/276F	0	0	0	0	1,067	0
HC07/276J	0	1,6	0	0	0,533	0
HC07/276L	1,067	0	0	0	0	0
HC07/315A	0,533	0	0	0	0	0
HC07/315B	0,533	0	0	0	0	0
HC07/315E	0	0	0	0	0,533	2,133
HC07/315F	0	0	0	0	0,533	0
HC07/315J	0	0	0	0	0	0
HC07/315L	0,533	0	0	0	0	0
HC07/369A	0	0	0	0	0,533	0
HC07/369B	0	0	0	0,533	0	0
HC07/369E	0,533	0	0	0	0,533	0
HC07/369F	0,533	0,533	0	0	0	0
HC07/369J	0	0	0	0	0	0
HC07/369L	0	0	0	0	0,533	0
SVO3376/08A	1,067	0,533	0	0	1,6	1,067
SVO3376/08B	0	0,533	0,533	0,533	1,6	0
SVO3376/08E	0,533	1,067	1,067	0,533	1,067	0
SVO3376/08F	0	1,067	0	0	0,533	0,533
SVO3376/08J	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08L	0	1,067	0	0	0	0
SVO3474/08A	1,067	1,6	0	0	2,133	0,533
SVO3474/08B	0	0	0	0,533	1,067	0,533
SVO3474/08E	0	0	0,533	0	0,533	0
SVO3474/08F	1,067	1,067	0	0	1,067	0
SVO3474/08J	0,533	1,067	0	0	2,133	0
SVO3474/08L	0	0	0	0,533	0	0
SVO3660/08A	1,067	4,267	0	0,533	0,533	0,533
SVO3660/08B	0	0	0	0	0,533	1,067
SVO3660/08E	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08F	0	0,533	0	0	0	0,533
SVO3660/08J	1,067	0	0	0	0	0
SVO3660/08L	0,533	0,533	0	0	0	0
SVO3884/08A	0	0	0	0	0,533	0
SVO3884/08B	0	0	0	0	1,067	1,6
SVO3884/08E	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08F	1,067	0	0	0	0,533	0
SVO3884/08J	0	0	0	0	0,533	0
SVO3884/08L	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08A	0	0	0	0	0,533	0
SVO3891/08B	0	0	0	0	2,133	0,533
SVO3891/08E	0	1,067	0	0	0,533	0
SVO3891/08F	0	0	0	0	3,2	0
SVO3891/08J	0	0,533	0	0	0	0
SVO3891/08L	0	0	0	0	0	0

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

Grupo controle: contagem de células imunomarcadas expressando citocinas por mm² no microambiente perivascular

Casos	TNF- α	IFN- γ	TGF- β	IL1- β	IL-2R	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12
HC07/276A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315A	0,533	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315F	0,533	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/369A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/369B	0	0	0,533	0	0	0	0	0	0
HC07/369E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/369F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/369J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/369L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08B	0	0	0,533	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08E	0	1,067	0	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08L	0	0,533	0	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08F	0	0	1,067	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08A	0	0	0,533	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08E	0	0	1,067	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08L	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

Grupo controle: contagem de células expressando outros imunomarcadores por mm² no microambiente perivascular

Casos	Granzima	iNOS	Caspase 3
HC07/276A	0	0	0
HC07/276B	0	0	0
HC07/276E	0	0	0
HC07/276F	0	0	0
HC07/276J	0,533	0	0
HC07/276L	0	0	0
HC07/315A	0	0	0
HC07/315B	0	0	0
HC07/315E	1,6	0	0
HC07/315F	0	0	0
HC07/315J	0	0	0
HC07/315L	0	0	0
HC07/369A	0	0	0
HC07/369B	0	0	0
HC07/369E	0	0	0
HC07/369F	0	0	0
HC07/369J	0	0	0
HC07/369L	0	0	0
SVO3376/08A	0	0	0
SVO3376/08B	0	0	0
SVO3376/08E	0	0	0
SVO3376/08F	0	0	0
SVO3376/08J	0	0	0
SVO3376/08L	0	0	0
SVO3474/08A	0	0	0
SVO3474/08B	0	0	0
SVO3474/08E	0	0	0
SVO3474/08F	0	0	0
SVO3474/08J	0	0	0
SVO3474/08L	0	0	0
SVO3660/08A	0	0	0
SVO3660/08B	0	1,067	0
SVO3660/08E	0	0	0
SVO3660/08F	0	0	0
SVO3660/08J	0	0,533	0
SVO3660/08L	0	0	0
SVO3884/08A	0	0	0
SVO3884/08B	0	0	0
SVO3884/08E	0	0	0
SVO3884/08F	0	0,533	0
SVO3884/08J	0	0	0
SVO3884/08L	0	0	0
SVO3891/08A	0	0	0
SVO3891/08B	0	0	0
SVO3891/08E	0	0	0
SVO3891/08F	0	0	0
SVO3891/08J	0	0	0
SVO3891/08L	0	0	0

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

Grupo controle: contagem de células imunomarcadas por mm² no microambiente intraparenquimatoso

Casos	CD4	CD8	CD20	CD57	CD68	GFAP
HC07/276A	0	2,667	0	0	1,6	0
HC07/276B	0,533	0,533	0	0	2,133	2,667
HC07/276E	0	1,067	0	0	0,533	0
HC07/276F	1,6	1,067	0	0	3,2	0
HC07/276J	1,067	3,733	0	0	0,533	0
HC07/276L	1,6	0,533	0	0,533	1,6	0
HC07/315A	11,2	0	0	0	1,067	9,6
HC07/315B	11,733	0	0,533	0	1,067	20,8
HC07/315E	9,6	0	0	0	0,533	17,6
HC07/315F	7,467	0	0	0	0	21,867
HC07/315J	12,8	0	0	0,533	0	0,533
HC07/315L	3,2	0	0	1,6	1,067	0,533
HC07/369A	14,933	0	0	0,533	1,6	0
HC07/369B	10,133	0	0	0	0,533	0,533
HC07/369E	7,467	0,533	0	0	10,133	0
HC07/369F	18,667	1,067	0	0	4,267	0
HC07/369J	9,6	0,533	0	0	7,467	0
HC07/369L	4,267	0,533	0	0	4,8	0,533
SVO3376/08A	5,333	4,267	1,067	3,733	25,067	35,2
SVO3376/08B	1,6	0,533	0	1,067	13,867	31,467
SVO3376/08E	1,067	0,533	0	0	13,333	18,667
SVO3376/08F	0,533	0,533	0	0,533	15,467	2,667
SVO3376/08J	0	2,667	0	0	3,2	8
SVO3376/08L	9,067	0	0	1,6	30,933	0,533
SVO3474/08A	0	0	0	0,533	7,467	16
SVO3474/08B	2,667	1,067	0	1,067	20,267	45,333
SVO3474/08E	0	2,133	0	0	7,467	17,6
SVO3474/08F	2,133	1,067	0	0	17,067	14,933
SVO3474/08J	0	2,133	0	2,133	3,2	1,067
SVO3474/08L	5,333	1,067	0	1,6	13,333	0
SVO3660/08A	5,867	1,067	0	1,6	1,067	35,733
SVO3660/08B	0	0	0	1,067	10,667	28,267
SVO3660/08E	2,667	1,6	0	0,533	5,333	12,8
SVO3660/08F	2,133	0	0	0	21,333	6,933
SVO3660/08J	4,8	0,533	0,533	3,733	25,067	11,733
SVO3660/08L	6,933	1,067	1,067	0	2,667	0
SVO3884/08A	1,6	0	0	0	7,467	19,733
SVO3884/08B	1,6	0	0	0	14,933	13,333
SVO3884/08E	2,133	0	0	0,533	14,4	20,8
SVO3884/08F	1,067	1,067	0	3,2	14,933	5,333
SVO3884/08J	1,067	0	0	0,533	27,2	5,333
SVO3884/08L	0	0	0	1,067	5,867	0
SVO3891/08A	0	0	0	0	3,733	27,2
SVO3891/08B	1,067	1,6	0	2,667	5,867	21,867
SVO3891/08E	5,867	1,6	0	1,067	24	9,6
SVO3891/08F	2,667	0,533	0	0	16	15,467
SVO3891/08J	3,2	1,067	0	1,6	27,733	19,2
SVO3891/08L	3,2	4,267	0	0	33,6	0

A:córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

Grupo controle: contagem de células imunomarcadas expressando citocinas por mm² no microambiente intraparenquimatoso

Casos	TNF- α	IFN- γ	TGF- β	IL1- β	IL-2R	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12
HC07/276A	0,533	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276B	0	0	0	0	0	0	0,533	0	0
HC07/276E	0	0	0	0	0	0	0,533	0	0
HC07/276F	1,067	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/276L	0	0	0	0	0	1,067	0	0	6,933
HC07/315A	26,676	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315B	5,333	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315E	27,2	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315F	12,8	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315J	5,333	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/315L	1,6	0	0	1,067	0,533	0	0	0	1,067
HC07/369A	0	0	14,4	0	0,533	0	0	0	0
HC07/369B	0	0	13,333	0	0	0	3,2	0	0
HC07/369E	0	0	12,8	0	0	0	0	0	0
HC07/369F	0,533	0	0	0	0	0	0	0	0
HC07/369J	0	0	3,733	0	1,067	0	0	0	0
HC07/369L	0	0,533	6,4	0	0	0	0	0	6,4
SVO3376/08A	0,533	0	5,333	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08B	0	0,533	0,533	0	0	0	0	0	0,533
SVO3376/08E	0	0	3,2	0	0	0	0	0,533	1,067
SVO3376/08F	0,533	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08J	0	0	2,133	0	0	0	0	0	0
SVO3376/08L	0	0	2,667	0	0	0	0	0,533	0
SVO3474/08A	0	0	3,2	0	0	0	0	0,533	0,533
SVO3474/08B	0	0	1,6	0	0	0	0,533	0	0
SVO3474/08E	0	0	8,533	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08F	0	0	0	0	0	0	0	0	0,533
SVO3474/08J	0	0	3,2	0	0	0	0	0	0
SVO3474/08L	0	0	3,2	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08A	0	0	2,667	0	0	0	0	1,6	0,533
SVO3660/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08E	0	0	3,733	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08F	0	0	13,333	0	0	0	0	0	0
SVO3660/08J	0	0	0,533	0	0	0	0	1,067	0
SVO3660/08L	0	0	4,8	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08A	0	0	0,533	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08B	0	0	0,533	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08E	0	0	12,8	0	0	0	0	0,533	0
SVO3884/08F	0	0	3,2	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08J	0	0	6,4	0	0	0	0	0	0
SVO3884/08L	0	0	1,067	0	0	0	0	0,533	0
SVO3891/08A	0	0	2,133	0	0	0	0,533	0	1,067
SVO3891/08B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08E	0	0	14,4	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08F	0	0	1,067	0	0	0	0,533	0	0
SVO3891/08J	0	0	3,733	0	0	0	0	0	0
SVO3891/08L	0	0	9,6	0	0	0	4,8	0	0

A: córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

Grupo controle: contagem de células expressando outros imunomarcadores por mm² no microambiente intraparenquimatoso

Casos	Granzima	iNOS	Caspase3
HC07/276A	0	0	0
HC07/276B	0	0	0
HC07/276E	0	0	0
HC07/276F	1,067	1,6	0
HC07/276J	1,067	0	0
HC07/276L	2,667	1,6	0
HC07/315A	0,533	0	0
HC07/315B	1,6	0	0
HC07/315E	0	0	0
HC07/315F	2,133	0	0
HC07/315J	0	0	0
HC07/315L	0,533	0	0
HC07/369A	0,533	0	0
HC07/369B	0	0	0
HC07/369E	0,533	0	0
HC07/369F	0	0	0
HC07/369J	0,533	0	0
HC07/369L	0,533	0,533	6,4
SVO3376/08A	1,6	74,667	0
SVO3376/08B	0,533	53,867	0
SVO3376/08E	0,533	12,267	0
SVO3376/08F	0	4,8	0
SVO3376/08J	1,067	3,2	0
SVO3376/08L	0	0,533	0
SVO3474/08A	0	14,933	0
SVO3474/08B	0,533	1,067	0
SVO3474/08E	0	1,6	0
SVO3474/08F	0,533	1,067	0
SVO3474/08J	0	0	0
SVO3474/08L	0	0,533	0
SVO3660/08A	0	2,133	0
SVO3660/08B	0,533	20,8	0
SVO3660/08E	0	1,067	0
SVO3660/08F	0	0,533	0
SVO3660/08J	0	0	0
SVO3660/08L	0	0	0
SVO3884/08A	0,533	0,533	0
SVO3884/08B	3,733	30,933	0
SVO3884/08E	1,6	3,733	0
SVO3884/08F	2,667	4,267	0
SVO3884/08J	0,533	6,4	0
SVO3884/08L	0,533	10,133	0
SVO3891/08A	0	40,533	0
SVO3891/08B	0	14,4	0
SVO3891/08E	0	9,067	2,133
SVO3891/08F	0	9,067	0
SVO3891/08J	0	8	0
SVO3891/08L	0,533	3,2	1,6

A:córtex frontal; B: córtex parietal; E: hipocampo; F: núcleos da base; J: cerebelo; L: bulbo

Anexo D. Dados estatísticos das células imunomarcadas com o antígeno rábico, células inflamatórias, células expressando citocinas e outros marcadores nos microambientes e regiões do SNC

Comparação do número de neurônios e de células da glia imunomarcados com antígeno rábico por mm² no microambiente intraparenquimatoso

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Neurônios	9,829 ± 11,19 0 - 52,27 5,867	1 x 2
2. Glia	4,228 ± 5,226 0 - 19,73 2,4	p= 0,0029

Teste estatístico de Mann-Whitney

Comparação do número de neurônios e de células da glia imunomarcados com antígeno rábico por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Neurônios (CF)	3,4 ± 3,311 0 – 8,533 2,4	1 x 2
2. Glia (CF)	3,733 ± 6,686 0 – 19,73 0,800	NS
3. Neurônios (CP)	16,3 ± 17,08 3,733 – 52,27 9,6	3 x 4
4. Glia (CP)	5,533 ± 5,959 0 – 18,13 3,2	NS
5. Neurônios (HP)	6,080 ± 5,381 0 – 11,73 4,267	5 x 6
6. Glia (HP)	4,267 ± 4,494 0 – 9,067 2,667	NS
7. Neurônios (NB)	9,4 ± 12,88 0,533 – 38,93 3,734	7 x 8
8. Glia (NB)	7,267 ± 6,180 2,133 – 19,73 4,8	NS
9. Neurônios (CE)	9,981 ± 8,145 0 – 20,8 8,533	9 x 10
10. Glia (CE)	1,143 ± 1,067 0 – 4,8 0,533	NS
11. Neurônios (BL)	13,71 ± 11,72 0,533 – 31,47 9,6	11 x 12
12. Glia (BL)	2,286 ± 2,193 0 – 5,333 2,133	NS

CF: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e parahipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de linfócitos TCD4+ imunomarcados por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	14,73 ± 40,16 0 – 198,4 0	1 x 2 p>0,05
2. Controle (meninge)	1,228 ± 1,726 0 – 4,8 0	
3. Raiva (perivascular)	1,422 ± 3,987 0 – 20,27 0	3 x 4 p>0,05
4. Controle (perivascular)	0,244 ± 0,396 0 – 1,067 0	
5. Raiva (intraparenquimatoso)	2,248 ± 8,580 0 – 52,27 0	5 x 6 p<0,001
6. Controle (intraparenquimatoso)	4,156 ± 4,496 0 -18,67 2,4	

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de linfócitos TCD4+ imunomarcados por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	1,438 ± 3,776 0 – 16 0	1 x 2
2. Controle (CF)	2,203 ± 3,927 0 – 14,93 0	NS
3. Raiva (CP)	0,787 ± 2,840 0 – 12,8 0	3 x 4
4. Controle (CP)	1,721 ± 3,178 0 – 11,73 0,267	NS
5. Raiva (HP)	7,538 ± 16,23 0 – 59,20 0	5 x 6
6. Controle (HP)	1,768 ± 2,757 0 – 9,6 0	NS
7. Raiva (NB)	2,767 ± 6,128 0 – 20,27 0	7 x 8
8. Controle (NB)	2,433 ± 4,706 0 – 18,67 1,067	NS
9. Raiva (CE)	6,197 ± 24,37 0 – 112 0	9 x 10
10. Controle (CE)	1,889 ± 3,269 0 – 12,8 0,267	NS
11. Raiva (BL)	14,43 ± 44,9 0 – 198,4 0,533	11 x 12
12. Controle (BL)	1,770 ± 2,562 0 – 9,067 0,533	NS

CF: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e parahipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo
Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de linfócitos TCD8+ imunomarcados por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	54,03 ± 39,12 4,8 – 129,6 50,4	1 x 2
2. Controle (meninge)	1,691 ± 4,338 0 – 17,6 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	7,365 ± 11,38 0 – 56,53 4	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0,356 ± 0,741 0 – 4,267 0	p<0,001
5. Raiva (intraparenquimatoso)	44,51 ± 61,52 0 – 281,6 12	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,889 ± 1,108 0 – 4,267 0,533	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

Comparação do número de linfócitos TCD8+ imunomarcados por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	32,07 ± 45,65 0 – 187,7 16	1 x 2 p<0,001
2. Controle (CF)	1,673 ± 3,896 0 – 17,6 0	
3. Raiva (CP)	28,48 ± 42,51 1,067 – 121,6 7,734	3 x 4 p<0,001
4. Controle (CP)	0,485 ± 1,386 0 – 6,4 0	
5. Raiva (HP)	40,6 ± 50,35 0 – 129,6 20,8	5 x 6 p<0,01
6. Controle (HP)	0,467 ± 0,691 0 – 2,133 0	
7. Raiva (NB)	25,9 ± 36,02 0 – 126,4 8,8	7 x 8 p<0,05
8. Controle (NB)	0,533 ± 0,477 0 – 1,067 0,533	
9. Raiva (CE)	17,07 ± 27,68 0 – 110,4 5,6	9 x 10 NS
10. Controle (CE)	1,644 ± 3,728 0 – 17,6 0,267	
11. Raiva (BL)	57,81 ± 65,39 0 – 281,6 48	11 x 12 p<0,001
12. Controle (BL)	0,533 ± 1,091 0 – 4,267 0	

F: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e parahipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de linfócitos B (CD20+) imunomarcados por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	8,822 ± 24,22 0 – 132,8 1,6	1 x 2
2. Controle (meninge)	0,329 ± 1,10 0 – 4,8 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	2,502 ± 6,951 0 – 41,6 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0,044 ± 0,185 0 – 1,067 0	p<0,01
5. Raiva (intraparenquimatoso)	1,486 ± 2,289 0 – 8,533 0,533	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,067 ± 0,237 0 – 1,067 0	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

Comparação do número de linfócitos B (CD20+) imunomarcados por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	1,183 ± 2,501 0 – 8,533 0	1 x 2
2. Controle (CF)	0,432 ± 1,235 0 – 4,8 0	NS
3. Raiva (CP)	0,787 ± 1,366 0 – 4,8 0	3 x 4
4. Controle (CP)	0,194 ± 0,689 0 – 3,2 0	NS
5. Raiva (HP)	3,921 ± 6,773 0 – 20,8 1,6	5 x 6
6. Controle (HP)	0,667 ± 0,239 0 – 1,067 0	p<0,05
7. Raiva (NB)	1,733 ± 2,751 0 – 10,67 1,067	7 x 8
8. Controle (NB)	0 ± 0 0 – 0 0	p<0,01
9. Raiva (CE)	7,333 ± 29,59 0 – 132,8 0	9 x 10
10. Controle (CE)	0,022 ± 0,109 0 – 0,533 0	NS
11. Raiva (BL)	8,2 ± 10,89 0 – 41,6 4	11 x 12
12. Controle (BL)	0,046 ± 0,223 0 – 1,067 0	p<0,001

CF:córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células NK (CD57+) imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	4,533 ± 8,267 0 – 35,2 0	1 x 2
2. Controle (meninge)	0,242 ± 0,583 0 – 1,6 0	p<0,05
3. Raiva (perivascular)	0,419 ± 0,812 0 – 4,267 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0,067 ± 0,178 0 – 0,533 0	NS
5. Raiva (intraparenquimatoso)	1,981 ± 3,918 0 – 18,67 1,067	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,689 ± 1,008 0 – 3,733 0	NS

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células NK (CD57+) imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	2,133 ± 4,360 0 – 19,2 0,533	1 x 2
2. Controle (CF)	0,315 ± 0,85 0 – 3,733 0	NS
3. Raiva (CP)	0,762 ± 1,614 0 – 6,4 0	3 x 4
4. Controle (CP)	0,485 ± 0,735 0 – 2,667 0	NS
5. Raiva (HP)	2,738 ± 6,387 0 – 24 0	5 x 6
6. Controle (HP)	0,255 ± 0,505 0 – 1,6 0	NS
7. Raiva (NB)	2,5 ± 4,288 0 – 17,6 1,334	7 x 8
8. Controle (NB)	0,233 ± 0,802 0 – 3,2 0	p<0,05
9. Raiva (CE)	2,947 ± 8,257 0 – 35,2 0	9 x 10
10. Controle (CE)	0,422 ± 0,930 0 – 3,733 0	NS
11. Raiva (BL)	1,733 ± 4,156 0 – 18,67 0,267	11 x 12
12. Controle (BL)	0,315 ± 0,586 0 – 1,6 0	NS

CF: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de macrófagos (CD68+) imunomarcados por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	11,81 ± 14,24 0 – 70,40 9,6	1 x 2
2. Controle (meninge)	1,128 ± 1,948 0 – 8 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	2,146 ± 2,862 0 – 13,33 1,067	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0,577 ± 0,72 0 - 3,2 0,533	NS
5. Raiva (intraparenquimatoso)	29,46 ± 41,26 0 – 205,4 14,4	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	9,889 ± 9,492 0 – 33,6 6,667	NS

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de macrófagos (CD68+) imunomarcados por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	10,06 ± 18,37 0 – 70,4 3,2	1 x 2
2. Controle (CF)	2,521 ± 5,477 0 – 25,07 0,533	NS
3. Raiva (CP)	8,127 ± 11,6 0 – 43,73 3,2	3 x 4
4. Controle (CP)	3,733 ± 5,810 0 – 20,27 1,067	NS
5. Raiva (HP)	16,5 ± 24,35 0 – 89,07 6,4	5 x 6
6. Controle (HP)	4,378 ± 7,423 0 – 27,20 0,8	NS
7. Raiva (NB)	18,17 ± 21,17 0 – 73,07 8,533	7 x 8
8. Controle (NB)	5,633 ± 7,349 0 – 21,33 2,134	NS
9. Raiva (CE)	7,975 ± 15,24 0 – 56 1,6	9 x 10
10. Controle (CE)	3,956 ± 7,291 0 – 27,73 1,333	NS
11. Raiva (BL)	30,11 ± 54,16 1,067 - 205,9 9,867	11x 12
12. Controle (BL)	4,104 ± 9,402 0 – 33,6 0	p<0,001

CF:córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de astrócitos (GFAP+) imunomarcados por mm² no microambiente intraparenquimatoso

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva	15,83 ± 11,41 1,067 – 43,20 14,13	1 x 2
2. Controle	10,82 ± 11,84 0 – 45,33 7,467	p= 0,0092

Teste estatístico de Mann-Whitney

Comparação do número de astrócitos (GFAP+) imunomarcados por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	14,13 ± 9,789 1,6 – 26,13 12,27	1 x 2
2. Controle (CF)	17,93 ± 14,25 0 – 35,73 17,87	NS
3. Raiva (CP)	29,18 ± 11,59 12,8 – 42,13 30,40	3 x 4
4. Controle (CP)	20,53 ± 14,96 0,533 – 45,33 21,33	NS
5. Raiva (HP)	9,6 ± 5,212 2,667 – 17,07 8,533	5 x 6
6. Controle (HP)	12,13 ± 8,271 0 – 20,8 15,2	NS
7. Raiva (NB)	21,4 ± 9,521 11,73 – 43,2 19,47	7 x 8
8. Controle (NB)	8,4 ± 8,102 0 – 21,87 6,133	NS
9. Raiva (CE)	10,97 ± 8,538 2,133 – 22,93 9,067	9 x 10
10. Controle (CE)	5,733 ± 6,491 0 – 19,2 3,2	NS
11. Raiva (BL)	7,390 ± 7,152 1,067 – 21,87 5,333	11 x 12
12. Controle (BL)	0,110 ± 0,276 0 – 0,533 0	NS

CF: córtex frontal; **CP:** córtex parietal; **HP:** hipocampo e para-hipocampal; **NB:** núcleos da base; **CE:** cerebelo; **BL:** bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando TNF- α imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média \pm DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	5,390 \pm 8,289 0 – 30,4 1,6	1 x 2
2. Controle (meninge)	0,047 \pm 0,274 0 – 1,6 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	0,521 \pm 0,820 0 – 2,667 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0,022 \pm 0,108 0 – 0,533 0	p<0,05
5. Raiva (intraparenquimatoso)	4,559 \pm 6,975 0 - 30,4 1,334	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	1,711 \pm 5,718 0 – 27,2 0	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

Comparação do número de células expressando TNF- α imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média \pm DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	1,901 \pm 3,638 0 – 14,4 0	1 x 2
2. Controle (CF)	1,346 \pm 5,807 0 – 26,68 0	NS
3. Raiva (CP)	1,346 \pm 2,885 0 – 11,73 0	3 x 4
4. Controle (CP)	0,242 \pm 1,137 0 – 5,333 0	NS
5. Raiva (HP)	4,942 \pm 7,103 0 – 24 1,067	5 x 6
6. Controle (HP)	1,133 \pm 5,552 0 - 27,20 0	p<0,001
7. Raiva (NB)	4,3 \pm 7,639 0 – 28,27 1,334	7 x 8
8. Controle (NB)	0,967 \pm 3,172 0 - 12,8 0	NS
9. Raiva (CE)	3,173 \pm 6,328 0 – 25,6 0,267	9 x 10
10. Controle (CE)	0,222 \pm 1,089 0 - 5,333 0	NS
11. Raiva (BL)	5,101 \pm 9,071 0 – 30,4 1,6	11 x 12
12. Controle (BL)	0,139 \pm 0,461 0 – 1,6 0	p<0,001

CF: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo
Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IFN- γ imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média \pm DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	0,258 \pm 1,020 0- 4,8 0	1 x 2
2. Controle (meninge)	0 \pm 0 0 - 0 0	NS
3. Raiva (perivascular)	0,038 \pm 0,139 0- 0,533 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0,033 \pm 0,17 0 - 1,067 0	NS
5. Raiva (intraparenquimatoso)	0,394 \pm 0,773 0 - 4,267 0	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,022 \pm 0,108 0 - 0,533 0	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significativa

Comparação do número de células expressando IFN- γ imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média \pm DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	0,232 \pm 0,893 0 - 4,267 0	1 x 2
2. Controle (CF)	0 \pm 0 0 - 0 0	NS
3. Raiva (CP)	0,0762 \pm 0,255 0 - 1,067 0	3 x 4
4. Controle (CP)	0,0242 \pm 0,114 0 - 0,533 0	NS
5. Raiva (HP)	0,640 \pm 1,294 0 - 4,8 0	5 x 6
6. Controle (HP)	0,044 \pm 0,218 0 - 1,067 0	p<0,05
7. Raiva (NB)	0,167 \pm 0,376 0 - 1,067 0	7 x 8
8. Controle (NB)	0 \pm 0 0 - 0 0	NS
9. Raiva (CE)	0,140 \pm 0,210 0 - 1,067 0	9 x 10
10. Controle (CE)	0 \pm 0 0 - 0 0	NS
11. Raiva (BL)	0,203 \pm 0,705 0 - 3,2 0	11 x 12
12. Controle (BL)	0,046 \pm 0,154 0 - 0,533 0	NS

CF:córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando TGF- β imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média \pm DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	3,932 \pm 3,971 0 – 12,8 3,2	1 x 2
2. Controle (meninge)	0,549 \pm 1,22 0 – 4,8 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	1,511 \pm 2,686 0 – 12,8 0,267	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0,078 \pm 0,246 0 – 1,067 0	p<0,05
5. Raiva (intraparenquimatoso)	7,784 \pm 7,8 0 – 28,27 5,333	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	3,433 \pm 4,503 0 – 14,4 1,867	NS

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando TGF- β imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média \pm DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	3,872 \pm 4,440 0 – 14,4 3,2	1 x 2
2. Controle (CF)	1,527 \pm 3,197 0 – 14,4 0	NS
3. Raiva (CP)	4,811 \pm 5,594 0 – 21,87 3,733	3 x 4
4. Controle (CP)	0,848 \pm 2,830 0 – 13,33 0	NS
5. Raiva (HP)	3,058 \pm 4,794 0 – 13,87 0	5 x 6
6. Controle (HP)	2,356 \pm 4,663 0 – 14,4 0	NS
7. Raiva (NB)	4,233 \pm 6,565 0 – 19,20 0,8	7 x 8
8. Controle (NB)	1,167 \pm 3,352 0 – 13,33 0	NS
9. Raiva (CE)	4,280 \pm 6,536 0 – 20,8 1,6	9 x 10
10. Controle (CE)	1,156 \pm 1,865 0 – 6,4 0	NS
11. Raiva (BL)	6,044 \pm 7,694 0 – 28,27 4,267	11 x 12
12. Controle (BL)	1,415 \pm 2,626 0 – 9,6 0	NS

CF: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-1 β imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média \pm DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	3,493 \pm 9,434 0 – 48 0	1 x 2
2. Controle (meninge)	0,0471 \pm 0,274 0 – 1,6 0	p<0,01
3. Raiva (perivascular)	0,152 \pm 0,988 0 – 6,4 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0 \pm 0 0 – 0 0	NS
5. Raiva (intraparenquimatoso)	1,575 \pm 3,450 0 – 16 0	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,022 \pm 0,154 0 – 1,067 0	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-1 β imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média \pm DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	1,113 \pm 2,352 0 – 8,533 0	1 x 2
2. Controle (CF)	0 \pm 0 0 – 0 0	NS
3. Raiva (CP)	2,921 \pm 10,6 0 – 48 0	3 x 4
4. Controle (CP)	0 \pm 0 0 – 0 0	NS
5. Raiva (HP)	2,987 \pm 5,549 0 – 16 0	5 x 6
6. Controle (HP)	0,067 \pm 0,327 0 – 1,6 0	NS
7. Raiva (NB)	1,2 \pm 4,003 0 – 16 0	7 x 8
8. Controle (NB)	0 \pm 0 0 – 0 0	NS
9. Raiva (CE)	0,360 \pm 0,957 0 – 4 0	9 x 10
10. Controle (CE)	0 \pm 0 0 – 0 0	NS
11. Raiva (BL)	1,010 \pm 2,765 0 – 11,2 0	11 x 12
12. Controle (BL)	0,046 \pm 0,223 0 – 1,067 0	NS

CF: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-2r imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	1,350 ± 4,206 0 – 22,4 0	1 x 2
2. Controle (meninge)	0 ± 0 0 – 0 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	0 ± 0 0 – 0 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
5. Raiva (intraparenquimatoso)	0,051 ± 0,197 0 – 1,067 0	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,044 ± 0,185 0 – 1,067 0	NS

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-2r imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	0,371 ± 1,667 0 – 8 0	1 x 2
2. Controle (CF)	0,024 ± 0,113 0 – 0,533 0	NS
3. Raiva (CP)	0,279 ± 0,784 0 – 3,2 0	3 x 4
4. Controle (CP)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
5. Raiva (HP)	1,6 ± 5,769 0 – 22,4 0	5 x 6
6. Controle (HP)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
7. Raiva (NB)	0 ± 0 0 – 0 0	7 x 8
8. Controle (NB)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
9. Raiva (CE)	0,076 ± 0,349 0 – 1,6 0	9 x 10
10. Controle (CE)	0,044 ± 0,218 0 – 1,067 0	NS
11. Raiva (BL)	0,267 ± 1,074 0 – 4,8 0	11 x 12
12. Controle (BL)	0,024 ± 0,113 0 – 0,533 0	NS

CF:córtex frontal; **CP:** córtex parietal; **HP:** hipocampo e para-hipocampal; **NB:** núcleos da base; **CE:** cerebelo; **BL:** bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-4 imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	5,588 ± 7,616 0 – 30 1,6	1 x 2
2. Controle (meninge)	0 ± 0 0 – 0 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	2,235 ± 4,582 0 – 22,93 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0 ± 0 0 – 0 0	p<0,001
5. Raiva (intraparenquimatoso)	2,794 ± 6,078 0 – 32 0,533	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,022 ± 0,154 0 – 1,067 0	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

Comparação do número de células expressando IL-4 imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	4,916 ± 7,134 0 – 20,8 0,533	1 x 2 p<0,001
2. Controle (CF)	0 ± 0 0 – 0 0	
3. Raiva (CP)	2,921 ± 5,807 0 – 22,93 0	3 x 4 NS
4. Controle (CP)	0 ± 0 0 – 0 0	
5. Raiva (HP)	4,373 ± 5,623 0 – 15,47 2,133	5 x 6 p<0,001
6. Controle (HP)	0 ± 0 0 – 0 0	
7. Raiva (NB)	1,733 ± 2,825 0 – 8,533 0	7 x 8 NS
8. Controle (NB)	0 ± 0 0 – 0 0	
9. Raiva (CE)	2,913 ± 7,040 0 – 30 0	9 x 10 NS
10. Controle (CE)	0 ± 0 0 – 0 0	
11. Raiva (BL)	3,048 ± 6,991 0 – 32 0,533	11 x 12 p<0,05
12. Controle (BL)	0,049 ± 0,228 0 – 1,067 0	

CF:córtex frontal; **CP:** córtex parietal; **HP:** hipocampo e para-hipocampal; **NB:** núcleos da base; **CE:** cerebelo; **BL:** bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-6 imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	2,080 ± 3,785 0 – 12,8 0	1 x 2
2. Controle (meninge)	0 ± 0 0 – 0 0	p<0,01
3. Raiva (perivascular)	0,234 ± 0,597 0 – 2,667 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
5. Raiva (intraparenquimatoso)	1,106 ± 2,413 0 – 12,8 0	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,222 ± 0,829 0 – 4,8 0	p<0,05

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-6 imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	1,183 ± 2,845 0 – 12,8 0	1 x 2
2. Controle (CF)	0,0242 ± 0,114 0 – 0,533 0	NS
3. Raiva (CP)	0,933 ± 2,560 0 – 11,2 0	3 x 4
4. Controle (CP)	0,194 ± 0,689 0 – 3,2 0	NS
5. Raiva (HP)	1,493 ± 2,653 0 – 9,6 0	5 x 6
6. Controle (HP)	0,022 ± 0,109 0 – 0,533 0	p<0,05
7. Raiva (NB)	0,467 ± 0,889 0 – 2,667 0	7 x 8
8. Controle (NB)	0,033 ± 0,133 0 – 0,533 0	NS
9. Raiva (CE)	0,2133 ± 0,722 0 – 3,2 0	9 x 10
10. Controle (CE)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
11. Raiva (BL)	2,074 ± 3,889 0 – 12,8 0	11 x 12
12. Controle (BL)	0,209 ± 1,001 0 – 4,8 0	NS

CF:córtex frontal; **CP:** córtex parietal; **HP:** hipocampo e para-hipocampal; **NB:** núcleos da base; **CE:** cerebelo; **BL:** bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-10 imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	6,050 ± 8,366 0 – 35,20 3,2	1 x 2
2. Controle (meninge)	0 ± 0 0 – 0 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	1,181 ± 2,433 0 – 13,33 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0 ± 0 0 – 0 0	p<0,001
5. Raiva (intraparenquimatoso)	2,895 ± 4,133 0 – 24,53 1,6	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,111 ± 0,310 0 – 1,6 0	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

Comparação do número de células expressando IL-10 imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	3,177 ± 5,727 0 – 27,20 1,6	1 x 2
2. Controle (CF)	0,102 ± 0,363 0 – 1,6 0	p<0,001
3. Raiva (CP)	1,397 ± 1,586 0 – 6,4 1,6	3 x 4
4. Controle (CP)	0 ± 0 0 – 0 0	p<0,001
5. Raiva (HP)	4,267 ± 6,788 0 – 22,4 0,533	5 x 6
6. Controle (HP)	0,044 ± 0,151 0 – 0,533 0	p<0,05
7. Raiva (NB)	3,767 ± 6,085 0 – 24,53 2,133	7 x 8
8. Controle (NB)	0 ± 0 0 – 0 0	p<0,001
9. Raiva (CE)	0,907 ± 1,782 0 – 8 0,533	9 x 10
10. Controle (CE)	0,0445 ± 0,218 0 – 1,067 0	NS
11. Raiva (BL)	5,714 ± 7,701 0 – 35,20 3,733	11 x 12
12. Controle (BL)	0,046 ± 0,154 0 – 0,533 0	p<0,001

CF: córtex frontal; **CP:** córtex parietal; **HP:** hipocampo e para-hipocampal; **NB:** núcleos da base; **CE:** cerebelo; **BL:** bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-12 imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	5,950 ± 6,058 0 – 24 6,4	1 x 2
2. Controle (meninge)	0,0470 ± 0,274 0 – 1,6 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	0,419 ± 0,954 0 – 3,733 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
5. Raiva (intraparenquimatoso)	1,892 ± 3,282 0 – 18,67 1,067	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,389 ± 1,355 0 – 6,933 0	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando IL-12 imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	2,041 ± 3,662 0 – 14,4 0	1 x 2
2. Controle (CF)	0,097 ± 0,267 0 – 1,067 0	NS
3. Raiva (CP)	2,641 ± 5,618 0 – 24 0	3 x 4
4. Controle (CP)	0,097 ± 0,354 0 – 1,6 0	NS
5. Raiva (HP)	3,867 ± 5,693 0 - 17,6 0,533	5 x 6
6. Controle (HP)	0,044 ± 0,218 0 – 1,067 0	p<0,001
7. Raiva (NB)	0,960 ± 1,615 0 – 5,333 0	7 x 8
8. Controle (NB)	0,033 ± 0,133 0 – 0,533 0	NS
9. Raiva (CE)	1,295 ± 2,4 0 – 9,6 0	9 x 10
10. Controle (CE)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
11. Raiva (BL)	3,886 ± 4,978 0 – 18,67 2,133	11 x 12
12. Controle (BL)	0,655 ± 1,961 0 – 6,933 0	p<0,001

CF:córtex frontal; **CP:** córtex parietal; **HP:** hipocampo e para-hipocampal; **NB:** núcleos da base; **CE:** cerebelo; **BL:** bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando granzima imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	5,264 ± 14,18 0 – 80 1,6	1 x 2
2. Controle (meninge)	1,842 ± 8,664 0 – 49,6 0	p<0,01
3. Raiva (perivascular)	0,711 ± 0,962 0 – 2,667 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0,044 ± 0,242 0 – 1,6 0	p<0,01
5. Raiva (intraparenquimatoso)	3,187 ± 4,075 0 – 14,4 1,6	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,567 ± 0,834 0 – 3,733 0,533	p<0,05

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

Comparação do número de células expressando granzima imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	4,397 ± 16,28 0 – 80 0	1 x 2
2. Controle (CF)	0,229 ± 0,494 0 – 1,6 0	NS
3. Raiva (CP)	2,507 ± 3,534 0 – 11,20 1,067	3 x 4
4. Controle (CP)	0,752 ± 1,635 0 – 6,4 0	NS
5. Raiva (HP)	0,784 ± 1,590 0 – 6,4 0	5 x 6
6. Controle (HP)	0,178 ± 0,463 0 – 1,6 0	NS
7. Raiva (NB)	2,733 ± 3,378 0 – 13,87 1,867	7 x 8
8. Controle (NB)	0,40 ± 0,838 0 – 2,667 0	NS
9. Raiva (CE)	3,120 ± 4,730 0 – 16 0,534	9 x 10
10. Controle (CE)	2,222 ± 10,10 0 – 49,6 0	NS
11. Raiva (BL)	2,993 ± 3,553 0 – 12,80 1,6	11 x 12
12. Controle (BL)	0,218 ± 0,586 0 – 2,667 0	p<0,01

CF: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando iNOS imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	8,764 ± 12,72 0 – 54,40 3,2	1 x 2
2. Controle (meninge)	0,547 ± 1,428 0 – 6,857 0	p<0,001
3. Raiva (perivascular)	0,757 ± 1,804 0 – 10,13 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0,044 ± 0,185 0 – 1,067 0	NS
5. Raiva (intraparenquimatoso)	4,292 ± 7,384 0 – 30,4 1,067	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	7,022 ± 14,72 0 – 74,67 1,067	NS

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células expressando iNOS imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	4,777 ± 8,102 0 – 27,20 1,067	1 x 2
2. Controle (CF)	6,476 ± 18,13 0 – 74,67 1,333	NS
3. Raiva (CP)	5,435 ± 10,46 0 – 40 0,533	3 x 4
4. Controle (CP)	5,770 ± 13,42 0 – 53,27 0	NS
5. Raiva (HP)	5,2 ± 13,39 0 – 54,40 0,800	5 x 6
6. Controle (HP)	1,222 ± 3,072 0 – 12,27 0	NS
7. Raiva (NB)	3,133 ± 5,849 0 – 23,47 1,333	7 x 8
8. Controle (NB)	1,367 ± 2,554 0 – 9,067 0	NS
9. Raiva (CE)	2,241 ± 4,623 0 – 17,60 0	9 x 10
10. Controle (CE)	1,108 ± 2,428 0 – 8 0	NS
11. Raiva (BL)	4,648 ± 8,141 0 – 30,40 0,533	11 x 12
12. Controle (BL)	0,752 ± 2,224 0 – 10,13 0	NS

CF: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células apoptóticas (caspase 3) imunomarcadas por mm² nos microambientes do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (meninge)	0,400 ± 0,813 0 – 3,2 0	1 x 2
2. Controle (meninge)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
3. Raiva (perivascular)	0,292 ± 0,626 0 – 2,133 0	3 x 4
4. Controle (perivascular)	0 ± 0 0 – 0 0	NS
5. Raiva (intraparenquimatoso)	4,566 ± 8,386 0 – 39,47 0,533	5 x 6
6. Controle (intraparenquimatoso)	0,211 ± 0,989 0 – 6,4 0	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de células apoptóticas (caspase 3) imunomarcadas por mm² nas diferentes regiões do SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Raiva (CF)	0,417 ± 0,662 0 - 1,6 0	1 x 2
2. Controle (CF)	0 ± 0 0 - 0 0	NS
3. Raiva (CP)	1,549 ± 3,317 0 - 11,73 0	3 x 4
4. Controle (CP)	0 ± 0 0 - 0 0	NS
5. Raiva (HP)	0,433 ± 0,831 0 - 2,667 0	5 x 6
6. Controle (HP)	0,089 ± 0,435 0 - 2,133 0	NS
7. Raiva (NB)	2,167 ± 4,553 0 - 14,40 0	7 x 8
8. Controle (NB)	0 ± 0 0 - 0 0	NS
9. Raiva (CE)	3,073 ± 7,359 0 - 23,47 0	9 x 10
10. Controle (CE)	0 ± 0 0 - 0 0	NS
11. Raiva (BL)	3,556 ± 9,456 0 - 39,47 0	11 x 12
12. Controle (BL)	0,364 ± 1,391 0 - 6,4 0	NS

CF: córtex frontal; CP: córtex parietal; HP: hipocampo e para-hipocampal; NB: núcleos da base; CE: cerebelo; BL: bulbo

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número de neurônios e de outras células apoptóticas imunomarcados por mm² no SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. Neurônios	0,486 ± 1,962 0 – 12,80 0	1 x 2
2. Outras células	4,340 ± 7,773 0 – 41,07 0,533	p= 0,0004

Teste estatístico de Mann-Whitney

Comparação do número geral de células imunomarcadas por mm² no SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. CD4 (raiva)	5,393 ± 22,37 0 – 198,4 0	1 x 2
2. CD4 (controle)	1,940 ± 3,340 0 – 18,67 0,533	NS
3. CD8 (raiva)	33,33 ± 47,16 0 - 281,6 9,067	3 x 4
4. CD8 (controle)	0,908 ± 2,417 0 – 17,60 0	p<0,001
5. CD20 (raiva)	3,834 ± 13,53 0 – 132,8 0	5 x 6
6. CD20 (controle)	0,1272 ± 0,597 0 – 4,8 0	p<0,001
7. CD57 (raiva)	2,077 ± 5,097 0 – 35,20 0	7 x 8
8. CD57 (controle)	0,343 ± 0,739 0 – 3,733 0	NS
9. CD68 (raiva)	14,73 ± 28,45 0 – 205,9 3,733	9 x 10
10. CD68 (controle)	4,136 ± 7,286 0 – 33,60 0,533	p<0,001
11. GFAP (raiva)	6,052 ± 10,14 0 – 43,20 0,533	11 x 12
12. GFAP (controle)	4,066 ± 8,839 0 – 45,33 0	p<0,05

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

Comparação do número geral de citocinas imunomarcadas por mm² no SNC

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. TNF-α (raiva)	3,308 ± 6,359 0 – 30,40 0,533	1 x 2
2. TNF-α (controle)	0,652 ± 3,549 0 – 27,20 0	p<0,001
3. IFN-γ (raiva)	0,227 ± 0,721 0 – 4,8 0	3 x 4
4. IFN-γ (controle)	0,020 ± 0,122 0 – 1,067 0	NS
5. TGF-β (raiva)	4,450 ± 5,984 0 – 28,27 1,867	5 x 6
6. TGF-β (controle)	1,433 ± 3,179 0 – 14,40 0	p<0,001
7. IL-1β (raiva)	1,556 ± 5,408 0 – 48 0	7 x 8
8. IL-1β (controle)	0,021 ± 0,168 0 – 1,6 0	p<0,01
9. IL-2r (raiva)	0,391 ± 2,267 0 – 22,40 0	9 x 10
10. IL-2r (controle)	0,0164 ± 0,114 0 – 1,067 0	NS
11. IL-4 (raiva)	3,362 ± 6,185 0 – 32 0	11 x 12
12. IL-4 (controle)	0,008 ± 0,094 0 – 1,067 0	p<0,001
13. IL-6 (raiva)	1,048 ± 2,550 0 – 12,80 0	13 x 14
14. IL-6 (controle)	0,081 ± 0,510 0 – 4,80 0	p<0,001
15. IL-10 (raiva)	3,145 ± 5,554 0 – 35,20 1,6	15 x 16
16. IL-10 (controle)	0,041 ± 0,195 0 – 1,6 0	p<0,001
17. IL-12 (raiva)	2,478 ± 4,369 0 – 24 0,533	17 x 18
18. IL-12 (controle)	0,156 ± 0,849 0 – 6,933 0	p<0,001

Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. NS: não significante

REFERÊNCIAS

9 - REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 4ª edição. Livraria e Editora Revinter Ltda. Rio de Janeiro, RJ; 2003.

Alcami A, Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today*. 2000;21(9):447-55.

Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(10):734-44.

Almeida MF, Martorelli LF, Aires CC, Barros RF, Massad E. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. *Virus Res*. 2008;137(2):275-7.

Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today*. 2000;21(3):141-7.

Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol*. 1998;160(10):4671-80.

Andersson PB, Perry VH, Gordon S. The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience*. 1992;48(1):169-86.

Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD. New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrghyzstan. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(3):333-7.

Araujo M de F, de Brito T, Machado CG. Myocarditis in human rabies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1971;13(2):99-102.

Assis RV, Rosemberg S. Human rabies. Neuropathological study of 30 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1984;26(6):346-52.

Awasthi M, Parmar H, Patankar T, Castillo M. Imaging findings in rabies encephalitis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001;22(4):677-80.

Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J Virol*. 2001;75(7):3268-76.

Baloul L, Lafon M. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie*. 2003;85(8):777-88.

Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol.* 1977;25:1-54.

Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia.* 1999;27(1):62-74.

Belotto A, Leanes LF, Schneider MC, Tamayo H, Correa E. Overview of rabies in the Americas. *Virus Res.* 2005;111(1):5-12.

Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem.* 1991;39(3):351-4.

Blenden DC, Bell JF, Tsao AT, Umoh JU. Immunofluorescent examination of the skin of rabies-infected animals as a means of early detection of rabies virus antigen. *J Clin Microbiol.* 1983;18(3):631-6.

Blond D, Campbell SJ, Butchart AG, Perry VH, Anthony DC. Differential induction of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha may account for specific patterns of leukocyte recruitment in the brain. *Brain Res.* 2002;958(1):89-99.

Botvinkin AD, Poleschuk EM, Kuzmin IV, Borisova TI, Gazaryan SV, Yager P, Rupprecht CE. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(12):1623-5.

Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149-60.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis.* 2004. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva.* Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>.

Brasil a. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Coordenação de Vigilância das Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. *Raiva Humana Brasil, 1986-2009**. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>.

Brasil b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Coordenação de Vigilância das Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. *Tratamento de caso de raiva humana em Floresta - Pernambuco (nota técnica de 11 de novembro de 2008)*. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Jawetz, Melnick & Adelberg - Microbiologia Médica*. Raiva & Infecções por Vírus Lentos. 21^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2000. pp: 426-431.

Brzózka K, Finke S, Conzelmann KK. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*. 2005; (12):7673-81.

Brzózka K, Finke S, Conzelmann KK. Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J Virol*. 2006;80(6):2675-83.

Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med*. 1993;117(12):1208-14.

Burton EC, Burns DK, Opatowsky MJ, El-Feky WH, Fischbach B, Melton L, Sanchez E, Randall H, Watkins DL, Chang J, Klintmalm G. Rabies encephalomyelitis: clinical, neuroradiological, and pathological findings in 4 transplant recipients. *Arch Neurol.* 2005;62(6):873-82.

Camelo S, Lafage M, Lafon M. Absence of the p55 Kd TNF-alpha receptor promotes survival in rabies virus acute encephalitis. *J Neurovirol.* 2000;6(6):507-18.

Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev.* 2003;27(5):397-404.

Carnieli P Jr, Brandão PE, Carrieri ML, Castilho JG, Macedo CI, Machado LM, Rangel N, de Carvalho RC, de Carvalho VA, Montebello L, Wada M, Kotait I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. *Virus Res.* 2006;120(1-2):113-20.

Carnieli P Jr, Fahl Wde O, Castilho JG, Oliveira Rde N, Macedo CI, Durymanova E, Jorge RS, Morato RG, Spíndola RO, Machado LM, Ungar de Sá JE, Carrieri ML, Kotait I. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Res.* 2008;131(1):33-46.

Carrieri ML, Mattos CA, Carnieli JRP, Mattos C, Favoretto SR, Kotatit I. Canine and feline rabies transmitted by variant 3 *Desmodus rotundus* in the State of São Paulo, Brazil. IN: *Seminário Internacional de Morcegos como transmissores de raiva*. São Paulo, Instituto Pasteur, Programas e resumos; 2001, p.51-52.

Celis E, Larson J, Otvos L Jr, Wunner WH. Identification of a rabies virus T cell epitope on the basis of its similarity with a hepatitis B surface antigen peptide presented to T cells by the same MHC molecule (HLA-DPw4). *J Immunol*. 1990;145(1):305-10.

Charlton KM, Casey GA. Experimental rabies in skunks: immunofluorescence light and electron microscopic studies. *Lab. Invest*. 1979;41:36-44.

Chelbi-Alix MK, Vidy A, El Bougrini J, Blondel D. Rabies viral mechanisms to escape the IFN system: the viral protein P interferes with IRF-3, Stat1, and PML nuclear bodies. *J Interferon Cytokine Res*. 2006;26(5):271-80.

Chopra JS, Banerjee AK, Murthy JM, Pal SR. Paralytic rabies: a clinico-pathological study. *Brain*. 1980;103(4):789-802.

Chung JY, Braunschweig T, Williams R, Guerrero N, Hoffmann KM, Kwon M, Song YK, Libutti SK, Hewitt SM. Factors in tissue handling and processing that impact RNA obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(11):1033-42.

Constantinescu CS, Tani M, Ransohoff RM, Wysocka M, Hilliard B, Fujioka T, Murphy S, Tighe PJ, Das Sarma J, Trinchieri G, Rostami A. Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *J Neurochem.* 2005;95(2):331-40.

Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(16):e12.

Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol.* 2005;58(8):894-5.

da Rosa ES, Kotait I, Barbosa TF, Carrieri ML, Brandão PE, Pinheiro AS, Begot AL, Wada MY, de Oliveira RC, Grisard EC, Ferreira M, Lima RJ, Montebello L, Medeiros DB, Sousa RC, Bensabath G, Carmo EH, Vasconcelos PF. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(8):1197-202.

Dermietzel R, Krause D. Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. *Int Rev Cytol.* 1991;127:57-109.

De Serres G, Dallaire F, Côte M, Skowronski DM. Bat rabies in the United States and Canada from 1950 through 2007: human cases with and without bat contact. *Clin Infect Dis.* 2008;46(9):1329-37.

Diaz AM, Papo S, Rodriguez A, Smith JS. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1994;41(3):153-60.

Dietzschold B, Kao M, Zheng YM, Chen ZY, Maul G, Fu ZF, Rupprecht CE, Koprowski H. Delineation of putative mechanisms involved in antibody-mediated clearance of rabies virus from the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):7252-6.

Dietzschold B, Koprowski H. Rabies transmission from organ transplants in the USA. *Lancet.* 2004;364(9435):648-9.

Dietzschold B, Morimoto K, Hooper DC. Mechanisms of virus-induced neuronal damage and the clearance of viruses from the CNS. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2001;253:145-55.

Dietzschold B, Schnell M, Koprowski H. Pathogenesis of rabies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;292:45-56.

Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, Lopes AD, Lafon M, Smith CL, Koprowski H. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(1):70-4.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87(6):2095-147.

Di Santo JP. Natural killer cells: diversity in search of a niche. *Nat Immunol*. 2008;9(5):473-5.

Dupont JR, Earle KM. Human rabies encephalitis. A study of forty-nine fatal cases with a review of the literature. *Neurology*. 1965;15(11):1023-34.

Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 2007;28(3):138-45.

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cells biology in interferon-gamma and receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571-611.

Favi M, de Mattos CA, Yung V, Chala E, López LR, de Mattos CC. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(1):79-81.

Fekadu M, Greer PW, Chandler FW, Sanderlin DW. Use of the avidin-biotin peroxidase system to detect rabies antigen in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Virol Methods.* 1988;19(2):91-6.

Fierz W, Endler B, Reske K, Wekerle H, Fontana A. Astrocytes as antigen-presenting cells. I. Induction of an antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J Immunol.* 1985;134(6):3785-93.

Finke S, Conzelmann KK. Replication strategies of rabies virus. *Virus Res.* 2005;111(2):120-31.

Fontana A, Erb P, Pircher H, Zinkernagel R, Weber E, Fierz W. Astrocytes as antigen-presenting cells. Part II: Unlike H-2K-dependent cytotoxic T cells, H-2Ia-restricted T cells are only stimulated in the presence of interferon-gamma. *J Neuroimmunol.* 1986;12(1):15-28

Fooks AR. Rabies remains a "neglected disease". *Euro Surveill.* 2005;(11):211-2.

Frazatti-Gallina NM, Mourão-Fuches RM, Paoli RL, Silva MLN, Miyaki C, Valentini EJJ, Raw I, Higashi HG. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*. 2004;23(4):511-7.

Fuerst HT. Recovery from rabies in man. *JAMA*. 1966;197(3):2.

Fu ZF, Jackson AC. Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection. *J Neurovirol*. 2005;11(1):101-6.

Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*. 2007;28(1):12-8.

Galelli A, Baloul L, Lafon M. Abortive rabies virus central nervous infection is controlled by T lymphocyte local recruitment and induction of apoptosis. *J Neurovirol*. 2000;6(5):359-72.

Gillet JP, Derer P, Tsiang H. Axonal transport of rabies virus in the central nervous system of the rat. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1986;45(6):619-34.

Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW, Jensen RH. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn*. 2000;2(2):84-91.

Gonçalves MA, Sá-Neto RJ, Brazil TK. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(5):461-4.

Grisi-Filho JH, Amaku M, Dias RA, Montenegro Netto H, Paranhos NT, Mendes MC, Ferreira Neto JS, Ferreira F. Use of geographic information systems in rabies vaccination campaigns. *Rev Saude Publica.* 2008;42(6):1005-11.

Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:65-91.

Hankins DG, Rosekrans JA. Overview, prevention, and treatment of rabies. *Mayo Clin Proc.* 2004;79(5):671-6.

Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurol.* 2002;1(2):101-9.

Hemachudha T, Phanuphak P, Sriwanthana B, Manutsathit S, Phanthumchinda K, Siriprasomsup W, Ukachoke C, Rasameechan S, Kaoroptham S. Immunologic study of human encephalitic and paralytic rabies. Preliminary report of 16 patients. *Am J Med.* 1988;84(4):673-7.

Hinrichsen SL, Nova VA, Rengell FS. Raiva IN: Foccacia R, Veronesi. *Tratado de Infectologia*. 3^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. Cap.29, pp.633-48.

Hooper DC. The role of immune responses in the pathogenesis of rabies. *J Neurovirol*. 2005;11(1):88-92.

Hooper DC, Morimoto K, Bette M, Weihe E, Koprowski H, Dietzschold B. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol*. 1998;72(5):3711-9.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(4):577-80.

Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*. 2001;24(12):719-25.

Hulshof S, Montagne L, De Groot CJ, Van Der Valk P. Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia*. 2002;38(1):24-35.

Instituto Pasteur de São Paulo. O que é raiva. 2002. Disponível em:
<http://www.pasteur.saude.sp.gov.br>.

Irwin DJ, Wunner WH, Ertl HC, Jackson AC. Basis of rabies virus neurovirulence in mice: expression of major histocompatibility complex class I and class II mRNAs. *Neurovirol.* 1999;5(5):485-94.

Jackson AC. Pathogenesis. In: Jackson AC, Wunner WH. Rabies. San Diego, Academic Press 2002.

Jackson AC. Rabies virus infection: an update. *J Neurovirol.* 2003;9(2):253-8.

Jackson AC, Fenton MB. Human rabies and bat bites. *Lancet.* 2001;357(9269):1714.

Jackson AC, Randle E, Lawrance G, Rossiter JP. Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis. *J Neurovirol.* 2008;14(5):368-75.

Jackson AC, Rossiter JP. Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection. *J Virol.* 1997;71(7):5603-7.

Jackson AC, Ye H, Ridaura-Sanz C, Lopez-Corella E. Quantitative study of the infection in brain neurons in human rabies. *J Med Virol*. 2001;65(3):614-8.

Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. 1987;325(6101):253-7.

Jogai S, Radotra BD, Banerjee AK. Immunohistochemical study of human rabies. *Neuropathology*. 2000;20(3):197-203.

Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol*. 2006;39(4):339-45.

Klintmalm GB, Cardo D, LeDuc J, Chamberland ME, Jernigan DB, Zaki SR; Rabies in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med*. 2005;352(11):1103-11.

Kreft ME, Romih R, Kreft M, Jezernik K. Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage. *Differentiation*. 2009 Jan;77(1):48-59. Epub 2008 Oct 25.

Krieglstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris*. 2002;96(1-2):25-30.

Kristensson K, Dastur DK, Manghani DK, Tsiang H, Bentivoglio M. Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1996;22(3):179-87.

Kucera P, Dolivo M, Coulon P, Flamand A. Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. *J Virol*. 1985;55(1):158-62.

Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, Rupprecht CE. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res*. 2003;97(2):65-79.

Lafon M. Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;289:239-58.

Lafon M, Jouvin-Marche E, Marche PN, Perron H. Human viral superantigens: to be or not to be transactivated. *Trends Immunol*. 2002;23(2):57-8.

Langevin C, Jaaro H, Bressanelli S, Fainzilber M, Tuffereau C. Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37655-62.

Lee EJ, Hung YC, Lee MY. Early alterations in cerebral hemodynamics, brain metabolism, and blood-brain barrier permeability in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg.* 1999;91(6):1013-9.

Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Crick J, Tignor GH. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science.* 1982;215(4529):182-4.

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:137-61.

Lodmell DL, Dimcheff DE, Ewalt LC. Viral RNA in the bloodstream suggests viremia occurs in clinically ill rabies-infected mice. *Virus Res.* 2006;116(1-2):114-8.

Lyles DS, Rupprecht CE. Rhabdoviridae. IN: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology.* 5^aed. Editora Lippincott Williams & Wilkins; 2007. Cap.39.pp:1364-1408.

Mahadevan A, Ms S, Sn M, Sk S. Tracking the footprints of the rabies virus: are we any closer to decoding this elusive virus? *J Clin Pathol*. 2008 published online 28 Aug.

Marquette C, Van Dam AM, Ceccaldi PE, Weber P, Haour F, Tsiang H. Induction of immunoreactive interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in the brains of rabies virus infected rats. *J Neuroimmunol*. 1996;68(1-2):45-51.

Matsumoto S. Electron microscope studies of rabies virus in mouse brain. *J Cell Biol*. 1963;19:565-91

Matyszak MK, Perry VH. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience*. 1996;74(2):599-608.

Megid J, Kaneno R. Natural killer activity in mice infected with rabies virus and submitted to *P. acnes* (*Propionibacterium acnes*) as immunomodulator. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2000;23(2):91-7.

Meinl E, Aloisi F, Ertl B, Weber F, de Waal Malefyt R, Wekerle H, Hohlfeld R. Multiple sclerosis. Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells. *Brain*. 1994;117 (Pt 6):1323-32.

Mifune K, Takeuchi E, Napiorkowski PA, Yamada A, Sakamoto K. Essential Role of T cells in the postexposure prophylaxis of rabies in mice. *Microbiol Immunol.* 1981;25(9):895-904.

Miller A, Morse HC 3rd, Winkelstein J, Nathanson N. The role of antibody in recovery from experimental rabies. I. Effect of depletion of B and T cells. *J Immunol.* 1978;121(1):321-6.

Morimoto K, Hooper DC, Spitsin S, Koprowski H, Dietzschold B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J Virol.* 1999;73(1):510-8.

Moscoso LM, Cremer H, Sanes JR. Organization and reorganization of neuromuscular junctions in mice lacking neural cell adhesion molecule, tenascin-C, or fibroblast growth factor-5. *J Neurosci.* 1998;18(4):1465-77.

Nuovo GJ, Defaria DL, Chanona-Vilchi JG, Zhang Y. Molecular detection of rabies encephalitis and correlation with cytokine expression. *Mod Pathol.* 2005;18(1):62-7.

Panpanich T, Hemachudha T, Piyasirisilp S, Manatsathit S, Wilde H, Phanuphak P. Cells with natural killer activity in human rabies. *Clin Exp Immunol.* 1992;89(3):414-8.

Perry VH. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol.* 1998;90(2):113-21.

Perry LL, Lodmell D L. Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine resistance to street rabies virus. *J Virol.* 1991; 65(7): 3429–3434.

Phares TW, Kean RB, Mikheeva T, Hooper DC. Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system. *J Immunol.* 2006;176(12):7666-75.

Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci.* 2007;27(40):10714-21.

Queiroz LS. Sistema Nervoso IN: de Faria JL. *Patologia Especial com Aplicações Clínicas.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.;1999. Cap.VII, p : 535-537.

Ray NB, Ewalt LC, Lodmell DL. Rabies virus replication in primary murine bone marrow macrophages and in human and murine macrophage-like cell lines: implications for viral persistence. *J Virol.* 1995;69(2):764-72.

Ray NB, Power C, Lynch WP, Ewalt LC, Lodmell DL. Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. *Arch Virol.* 1997;142(5):1011-9.

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 5ª edição. Editora Mosby International Ltd, London, UK; 1998.

Roy A, Hooper DC. Immune evasion by rabies viruses through the maintenance of blood-brain barrier integrity. *J Neurovirol.* 2008;14(5):401-11.

Roy A, Phares TW, Koprowski H, Hooper DC. Failure to open the blood-brain barrier and deliver immune effectors to central nervous system tissues leads to the lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection. *J Virol.* 2007;81(3):1110-8.

Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis.* 2002;(6):327-43.

Sato G, Kobayashi Y, Shoji Y, Sato T, Itou T, Ito FH, Santos HP, Brito CJ, Sakai T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. *Arch Virol.* 2006;151(11):2243-51.

Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32(11-12):1123-36.

Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Körner H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today*. 2000;21(3):110-3.

Shankar V, Dietzschold B, Koprowski H. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. *J Virol*. 1991;65(5):2736-8.

Shin T, Weinstock D, Castro MD, Hamir AN, Wampler T, Walter M, Kim HY, Acland H. Immunohistochemical localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase within neurons of cattle with rabies. *J Vet Med Sci*. 2004;66(5):539-41.

Simonato LE, Garcia JF, Nunes CM, Miyahara, GI. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(2):121-27.

Sitprija V, Sriaroon C, Lumlerdaecha B, Wacharapluesadee S, Phumesin P, Khawplod P, Wilde H, Hemachudha T. Does contact with urine and blood from a rabid dog represent a rabies risk? *Clin Infect Dis*. 2003;37(10):1399-400.

Smith JS. Mouse model for abortive rabies infection of the central nervous system. *Infect Immun*. 1981;31(1):297-308.

Smith JS, Fishbein DB, Rupprecht CE, Clark K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. *N Engl J Med.* 1991;324(4):205-11.

Srinivasan A, Burton EC, Kuehnert MJ, Rupprecht C, Sutker WL, Ksiazek TG, Paddock CD, Guarner J, Shieh WJ, Goldsmith C, Hanlon CA, Zoretic J, Fischbach B, Niezgodá M, El-Feky WH, Orciari L, Sanchez EQ, Likos A,

Suja MS, Mahadevan A, Sundaram C, Mani J, Sagar BC, Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Madhusudana SN, Shankar SK. Rabies encephalitis following fox bite--histological and immunohistochemical evaluation of lesions caused by virus. *Clin Neuropathol.* 2004;23(6):271-6.

Templeton JW, Holmberg C, Garber T, Sharp RM. Genetic control of serum neutralizing-antibody response to rabies vaccination and survival after a rabies challenge infection in mice. *J Virol.* 1986;59(1):98-102.

Thoulouze MI, Lafage M, Montano-Hirose JA, Lafon M. Rabies virus infects mouse and human lymphocytes and induces apoptosis. *J Virol.* 1997;71(10):7372-80.

Thoulouze MI, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol.* 1998;72(9):7181-90.

Tissari J, Sirén J, Meri S, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *J Immunol.* 2005;174(7):4289-94.

Trajkovic V, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Miljkovic D, Popadic D, Markovic M, Bumbasirevic V, Backovic A, Cvetkovic I, Harhaji L, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia.* 2004;47(2):168-79.

Tsiang H. Evidence for an intraaxonal transport of fixed and street rabies virus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1979;38(3):286-99

Tsiang H, Ceccaldi PE, Lycke E. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. *J Gen Virol.* 1991;72:1191-4.

Tuffereau C, Bénéjean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 1998;17(24):7250-9.

Ubol S, Sukwattanapan C, Maneerat Y. Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice. *J Med Microbiol.* 2001;50(3):238-42.

Vidy A, Chelbi-Alix M, Blondel D. Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways. *J Virol*. 2005;79(22):14411-20.

Wacharapluesadee S, Ruangvejvorachai P, Hemachudha T. A simple method for detection of rabies viral sequences in 16-year old archival brain specimens with one-week fixation in formalin. *J Virol Methods*. 2006;134(1-2):267-71.

Warrell MJ, Warrell DA. Rabies and other lyssavirus diseases. *Lancet*. 2004;363(9413):959-69.

Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, Kieny MP, Lathe R, Lecocq JP, Mackett M, Mosst B, Koprowski H. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(22):7194-8

Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, Chusid MJ, Rupprecht CE. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med*. 2005; 352(24):2508-14.

Woldehiwet, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies vírus. *Clinica Chimica Acta* 2005;351:49-63.

World Health Organization. *Strategies for the control and elimination of rabies in Ásia*. Geneva, Switzerland: WHO, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/en/>.

World Health Organization. *Epidemiology*. Geneva: WHO, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/en/>.

Yan X, Mohankumar PS, Dietzschold B, Schnell MJ, Fu ZF. The rabies virus glycoprotein determines the distribution of different rabies virus strains in the brain. *J Neurovirol*. 2002;8(4):345-52.

Zaidman GW, Billingsley A. Corneal impression test for the diagnosis of acute rabies encephalitis. *Ophthalmology*. 1998;105(2):249-51.

